



**Nádia Isabel Almeida
Osório**

**Importância das bactérias fixadoras de azoto na
rizosfera de halófitas**



**Nádia Isabel Almeida
Osório**

**Importância das bactérias fixadoras de azoto na
rizosfera de halófitas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Helena Abreu Silva, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação da Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

O júri

Presidente

Prof^a. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida,.
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof^a. Doutora Maria Helena Abreu Silva,.
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (Orientadora)

Prof^a. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha,.
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (Co-orientadora)

Prof. Dr. Newton Carlos Marcial Gomes
Investigador Auxiliar do CESAM (Arguente)

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que me ajudaram a tornar possível a realização deste trabalho;

À Doutora Helena Silva pela orientação, disponibilidade e apoio na realização deste trabalho.

À Doutora Ângela Cunha pela co-orientação, disponibilidade e apoio na realização deste trabalho.

À Ana Luísa Santos, pela amizade, pela companhia nos trabalhos laboratoriais, por toda a paciência, persistência, ajuda e apoio na realização deste trabalho.

À Vanessa Oliveira, pela amizade, pela companhia nos trabalhos de campo, ajuda e apoio na realização deste trabalho.

Ao Francisco, pela amizade e pela companhia nos trabalhos de análise de resultados e interpretação de dados.

À Carla e Catarina, pela amizade, ajuda e apoio na realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, que de alguma forma me ajudaram a concluir este trabalho.

À minha família, por todo o apoio, dedicação, paciência, incentivo e principalmente pela confiança que têm em mim.

O trabalho foi financiado pelo CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar) e foi parcialmente desenvolvido no LEMAM (Laboratório de Estudos Moleculares de Ambientes Marinhos).

palavras-chave

Sapal, azoto, rizosfera, halófitas, diversidade bacteriana, nitrogenases, gene nifH.

Resumo

Os sapais são zonas hidrodinâmicas de grande interesse não só por constituírem habitats permanentes ou temporários de espécies economicamente rentáveis como também pelo seu papel no controlo da inundação, erosão e retenção de metais pesados, para o qual as plantas do sapal (halófitas) contribuem de forma relevante. O azoto tem um papel crucial no metabolismo e crescimento das plantas, sendo geralmente utilizado sob a forma de iões amónio e nitrato. Esta última forma, é a mais disponível em solos, exceptuando os solos salinos. O azoto disponível em sedimentos de sapal pode resultar da acção de fixação das comunidades bacterianas (bactérias diazotróficas) que se encontram principalmente em sedimentos da rizosfera, usufruindo da maior disponibilidade de fontes de carbono orgânico, útil ao crescimento bacteriano, provenientes da exsudação das raízes.

Os objectivos gerais deste trabalho foram a caracterização e comparação de comunidades microbianas da rizosfera de duas plantas relevantes no sapal da Ria de Aveiro, com o intuito de avaliar o efeito da cobertura vegetal na abundância, estrutura e actividade das comunidades bacterianas. Por outro lado, pretendeu-se avaliar a frequência de bactérias fixadoras de azoto nas comunidades bacterianas das rizosferas e inferir sobre sua influência na produção de biomassa da planta.

Este estudo foi realizado em 2008 e 2009 em sapais das margens do Canal de Mira, localizados na Barra, Costa Nova e Vagueira. Em cada local, foram recolhidos sedimentos não colonizados (controlo), plantas das espécies *Halimione portulacoides*, e *Sarcocornia perennis perennis* bem como sedimentos associados às raízes destas. A análise granulométrica revelou sedimentos vasosos no sapal da Barra e areia nos sapais da Costa Nova e Vagueira, sendo o conteúdo em água menor neste último.

A quantificação de nitratos nas plantas, como factor condicionante da produção de biomassa em ambientes salinos, evidenciou valores mais elevados na Vagueira o que pode ser explicado pela menor salinidade deste local.

A maior abundância de procariotas foi encontrada em sedimentos da rizosfera de *H. portulacoides* e a maior abundância de bactérias diazotróficas cultiváveis foi registada no sapal da Barra onde a salinidade é mais elevada.

Os padrões de DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) de fragmentos dos genes de rRNA 16S, evidenciaram diferenças na estrutura das comunidades bacterianas das diferentes rizosferas. Diferenças nos padrões de DGGE de fragmentos do gene que codifica a nitrogenase (nifH) demonstraram diversidade funcional associada à fixação de azoto nas comunidades de diferentes plantas.

Os resultados demonstram que as interacções entre raízes e comunidades microbianas da rizosfera têm padrões específicos para cada planta e que se manifestam tanto ao nível da diversidade filogenética da comunidade como na diversidade de genes funcionais, implicando que factores que alterem a cobertura vegetal de bancos intertidais tenham influência nos processos microbianos envolvidos no ciclo do azoto em sedimentos estuarinos.

keywords

Salt marshes, nitrogen, rhizosphere, halophytes, bacterial diversity, nitrogenase, gene nifH.

Abstract

Salt marshes are hydrodynamic areas of great interest, not only because they constitute permanent or temporary habitats of species economically important, but also for its role in flood control, erosion and retention of heavy metals, in which the marsh plants (halophytes) have a relevant contribute. Nitrogen has a crucial role in metabolism and growth of plants, being generally used in the form of ammonium and nitrate ions. The latter form is the most available in most soil types, with exception saline soils. To availability of nitrogen in salt marsh sediments, contributes the action of nitrogen-fixing bacterial communities (diazotrophs) which are abundant in the rhizosphere sediment benefiting from the increased availability of organic carbon sources, useful for bacterial growth, derived from roots exudation.

The general objective of this study was to characterize and compare microbial communities from the rhizosphere of two marsh plants relevant to the Ria de Aveiro, in order to evaluate the effect of vegetation on the abundance, structure and activity of bacterial communities. Furthermore, we sought to assess the frequency of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere bacterial communities and infer on its influence on the production of plant biomass. This study was conducted in 2008 and 2009 on salt marshes along Canal Mira, located in Barra, Costa Nova and Vagueira. At each site, specimens of *Halimione portulacoides* and *Sarcocornia perennis perennis* as well as sediments associated with the roots of the plants and sediments from uncolonized banks (control) were collected. The granulometric analysis revealed muddy sediments in the salt marsh of Barra and sandy in the salt marshes of Costa Nova and Vagueira. The lower water content was found in Vagueira.

The quantification of nitrate in plants, as a major determinant of biomass production in saline environments, showed higher values in plants collected at Vagueira, which can be explained by the lower salinity of this site.

The higher abundance of prokaryotes was found in sediments from the rhizosphere of *H. portulacoides* and the greater abundance of cultivable diazotrophs was observed in the salt marsh of Barra, where salinity is higher.

The DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) profiles of 16S rRNA gene fragments, showed differences in the structure of bacterial communities from different rhizospheres. Differences in DGGE profiles of gene fragments encoding the nitrogenase (nifH) demonstrated functional diversity associated with nitrogen fixation in communities of the different plants.

The results showed that the interactions between roots and rhizosphere microbial communities have specific patterns for each plant and affect both in the phylogenetic diversity of the community and the diversity of functional genes. This implies that factors affecting the vegetation of tidal banks may have considerable influence on microbial processes involved in the nitrogen cycle in estuarine sediments.

ÍNDICE:

1- INTRODUÇÃO	1
1.1 - CICLO DO AZOTO	2
1.2 - COMUNIDADES MICROBIANAS NA RIZOSFERA	5
1.2.1 - <i>Bactérias fixadoras de azoto - Nitrogenase</i>	7
1.3 - DIAZOTROFIA EM SEDIMENTOS DO SAPAL	9
1.3.1 - <i>Vegetação do sapal</i>	12
1.3.1.1 - <i>Factores de stress nas halófitas: salinidade e encharcamento</i>	13
1.3.1.2 - <i>Défices nutricionais</i>	14
1.3.2 - <i>Metabolismo da vegetação halófitas</i>	16
1.4 - RIA DE AVEIRO	17
1.4.1 - <i>Halimione portucaloides</i>	17
1.4.2 - <i>Sarcocornia perennis subsp. perennis</i>	18
1.5 - OBJECTIVOS	19
2- MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 - ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM	21
2.2 - CARACTERIZAÇÃO DO SEDIMENTO	22
2.2.1 - <i>Conteúdo em água</i>	22
2.2.2 - <i>Salinidade, temperatura e potencial redox</i>	23
2.2.3 - <i>Matéria Orgânica</i>	23
2.2.4 - <i>Nutrientes: nitratos e nitritos</i>	23
2.2.5 - <i>Análise granulométrica</i>	24
2.3 - QUANTIFICAÇÃO DE NITRATOS NA PLANTA	25
2.4 - EXTRACÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS DO SEDIMENTO	25
2.5 - ISOLAMENTO E CULTIVO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO SEDIMENTO	26
2.6 - EXTRACÇÃO DE DNA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DO SEDIMENTO	27
2.7 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESTIRPES BACTERIANAS	28
2.7.1 - <i>Deteção do gene nif H nos isolados bacterianos</i>	29
2.7.2 - <i>Amplificação do gene 16S rRNA</i>	30
2.8 - IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR SEQUENCIAÇÃO	30
2.9 - EXTRACÇÃO DE DNA DA COMUNIDADE BACTERIANA TOTAL DA RIZOSFERA	31
2.10 - ANÁLISE DA DIVERSIDADE DO GENE 16S rRNA POR DGGE	32
2.11 - ANÁLISE DA DIVERSIDADE DO GENE NIF H POR DGGE	33
2.12 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GEIS DE DGGE (16S rRNA E NIFH)	35

3-RESULTADOS.....	37
3.1 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SEDIMENTOS.....	38
3.2 - CONCENTRAÇÃO DE NITRATO NOS TECIDOS DAS PLANTAS	41
3.3 – TEOR DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS CULTIVÁVEIS	42
3.4 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS	43
3.5 – DIVERSIDADE DAS COMUNIDADES BACTERIANAS (GENE 16S rRNA)	46
3.6 – DIVERSIDADE DAS COMUNIDADES BACTERIANAS DIAZOTRÓFICAS (GENE nifH)	49
4- DISCUSSÃO.....	52
4.1 – INFLUÊNCIA DAS INTERAÇÕES PLANTA-MICROORGANISMO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SEDIMENTO	53
4.2 – INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SEDIMENTO NA CONCENTRAÇÃO DE NITRATOS NA PLANTA.....	55
4.3 – ABUNDÂNCIA, DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E DIVERSIDADE DE GENES FUNCIONAIS	56
4.3.1 – <i>Diversidade de genes funcionais (gene nifH)</i>	57
4.3.2 – <i>Bactérias diazotróficas dos isolados</i>	58
5- CONCLUSÃO	60
6- BIBLIOGRAFIA.....	62

LISTAGEM DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo do azoto no ecossistema terrestre (adaptado de Sharma, 2005).....	3
Figura 2. Factores que influenciam as comunidades microbianas da rizosfera e modelo de como as comunidades microbianas são seleccionados no solo: pelos exsudados das raízes e competência da rizosfera (adaptado de Berg e Smalla, 2009)	6
Figura 3. Genes envolvidos na fixação de azoto (setas a vermelho) (adaptado de Steunou et al., 2006)	8
Figura 4. Perfil de um sapal (adaptado de Purinton e Mountain, 1998)	11
Figura 5. <i>Halimione portucaloides</i>	18
Figura 6. <i>Sarcocornia perennis</i> subsp. <i>perennis</i>	19
Figura 7. Ria de Aveiro (Portugal) – Os locais de amostragem estão assinalados com um círculo preto.	21
Figura 8. Concentração de nitrato (raiz, caule e folhas/artículos) de <i>Halimione portucaloides</i> e <i>Sarcocornia perennis</i> subsp. <i>perennis</i> em três locais de amostragem (Barra, Costa Nova e Vagueira) (média ± erro padrão; n=4).....	41
Figura 9. Abundância de bactérias diazotróficas nos sedimentos colonizados por <i>Halimione portucaloides</i> , <i>Sarcocornia perennis</i> e nos sedimentos controlos na Barra, Costa Nova e Vagueira.	42
Figura 10. Tipagem molecular por Box-PCR dos isolados bacterianos obtidos. *M - Marcador; 10 – Barra, banco de <i>H. portucaloides</i> ; 11 – Barra, banco de <i>S. perennis perennis</i> ; 12 e 13 – Costa Nova, banco de <i>H. portucaloides</i> ; 3 e 14 - Vagueira, controle; 4, 6, 7 e 12 - Vagueira, banco de <i>H. portucaloides</i> ; 5 - Vagueira, banco de <i>S. perennis perennis</i> ;	43
Figura 11. Grau de similaridade dos isolados obtidos a partir dos sedimentos de <i>Halimione portucaloides</i> , <i>Sarcocornia perennis perennis</i> e sedimentos controlos dos locais Barra, Costa Nova e Vagueira	44
Figura 12. Perfis de DGGE de fragmentos do gene 16S rRNA, amplificado a partir do sedimento da rizosfera de <i>H. portucaloides</i> , <i>S. perennis perennis</i> e de sedimento controlo (C). M - Marcador	46
Figura 13. Análise de DGGE para fragmentos do gene 16S rRNA, amplificado a partir do sedimento da rizosfera de <i>H. portucaloides</i> (n=4), <i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i> (n=4) e de sedimento controlo (n=1) da Barra, por NMDS (Método de escalonamento multidimensional não paramétrico).	47
Figura 14. Análise de DGGE para fragmentos do gene 16S rRNA, amplificado a partir do sedimento da rizosfera de <i>H. portucaloides</i> (n=4), <i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i> (n=4) e de sedimento controlo (n=1) da Costa Nova, por NMDS (Método de escalonamento multidimensional não paramétrico).	47
Figura 15. Análise de DGGE para fragmentos do gene 16S rRNA, amplificado a partir do sedimento da rizosfera de <i>H. portucaloides</i> (n=4), <i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i> (n=4) e de sedimento controlo (n=1) da Vagueira, por NMDS (Método de escalonamento multidimensional não paramétrico).	48
Figura 16. Análise de DGGE para fragmentos do gene <i>nifH</i> , amplificado a partir do sedimento da rizosfera de <i>H. portucaloides</i> (n=4), <i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i> (n=4) e de sedimento controlo (n=1) da Barra, por NMDS (Método de escalonamento multidimensional não paramétrico).	50

Figura 17. Análise de DGGE para fragmentos do gene <i>nifH</i> , amplificado a partir do sedimento da rizosfera de <i>H. portucaloides</i> (n=4), <i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i> (n=4) e de sedimento controlo (n=1) da Costa Nova, por NMDS (Método de escalonamento multidimensional não paramétrico).	50
Figura 18. Análise de DGGE para fragmentos do gene <i>nifH</i> , amplificado a partir do sedimento da rizosfera de <i>H. portucaloides</i> (n=4), <i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i> (n=4) e de sedimento controlo(n=1) da Vagueira, por NMDS (Método de escalonamento multidimensional não paramétrico).	51

LISTAGEM DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos sedimentos colonizados com <i>Halimione portucaloides</i> , <i>Sarcocornia perennis</i> subsp. <i>perennis</i> e não colonizados (controlo) na Barra, Costa Nova e Vagueira	38
Tabela 2. Caracterização granulométrica dos sedimentos colonizados com <i>Halimione portucaloides</i> , <i>Sarcocornia perennis</i> subsp. <i>perennis</i> e não colonizado (controlo) na Barra, Costa Nova e Vagueira.	40
Tabela 3. Grupos de isolados, após análise dos perfis de similaridade (Box-PCR)	44
Tabela 4. Resultados da análise da sequência de fragmentos do gene 16S rRNA dos isolados	45
Tabela 5. Análise da variância multivariável pelo pacote PERMANOVA do PRIMERV6 dos perfis de DGGE dos fragmentos dos genes 16S rRNA.	48
Tabela 6. Análise da variância multivariável pelo pacote PERMANOVA do PRIMERV6 dos perfis de DGGE dos fragmentos do gene nifH.	51

ABREVIATURAS

AMO	Enzima amónio monoxigenase
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	Basic local alignment search tool
BSA	Albumina do soro bovino
CO ₂	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
DGGE	Gel de electroforese com gradiente desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fe ²⁺	Ião ferro
HAO	Enzima hidroxilamina oxirreductase
KCl	Cloreto de potássio
Kg ha ⁻¹ ano ⁻¹	Kilograma por hectar por ano
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MoFe	Proteína molibdénio-ferro
Mn ²⁺	Ião manganês
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
N ₂	Azoto atmosférico
NaCl	Cloreto de sódio
NH ₃	Amónia
NH ₄ ⁺	Ião amónio
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amónio
NMDS	Método de escalonamento multidimensional não paramétrico
Pb	Prata
PCR	Reacção em cadeia com polimerase
PEP	Fosfoenolpiruvato
PERMANOVA	Análise de variância permutacional multivariável
PGA	Fosfoglicerato
RDP	Ribossomal Database project
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossómico
RUBP	Ribulose 1,5 bifosfato
S ²⁻	Ião Sulfureto
TAE	Tampão de Tris- Acetato-EDTA (tris hidroxilmetil aminometano)
Taq	Termófilos aquáticos
TE	Tampão Tris-EDTA
UFC	Unidade formadora de colónia
UFC gdw ⁻¹	Unidade formadora de colónia por grama de peso seco
UPGMA	Método de ligações médias
μmol gdw ⁻¹	Micromol por grama de peso seco

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Ciclo do azoto

As plantas necessitam de nutrientes inorgânicos para o seu crescimento normal. Carbono, hidrogénio e oxigénio são obtidos a partir da atmosfera e da água, sendo os restantes nutrientes absorvidos pelas raízes a partir do solo (Raven et al., 2005). A disponibilidade de nutrientes e a sua absorção pela planta depende da sua concentração, do pH e concentração de outros nutrientes no substrato (Grattan e Grieve, 1994).

A nível celular, a concentração de nutrientes é muito importante para a planta, afectando designadamente os processos de regulação da pressão osmótica e permeabilidade. Além disso, alguns nutrientes servem como substratos em ciclos bioquímicos e como activadores e/ou componentes de enzimas (Mauseth, 2003).

As plantas constituem elementos chave no ciclo do azoto, sendo o azoto presente no solo incorporado na sua biomassa e regressando novamente ao solo após morte da planta (Salsac et al., 1987).

O ciclo do azoto engloba uma grande variedade de processos biológicos e abióticos que envolve vários componentes nas fases gasosa, líquida e aquosa. Os compostos azotados desempenham também importantes papéis em vários temas ambientais contemporâneos, desde a perturbação do ozono estratosférico à contaminação das camadas de água subterrâneas (Sharma, 2005).

Muito do azoto presente na biosfera encontra-se associado a outros elementos da matéria viva, nomeadamente, carbono, enxofre e fósforo. Compreender o ciclo do azoto poderá também ajudar a perceber o papel da matéria viva nos ciclos biogeoquímicos. O azoto está ainda implicado nos vários modos como o Homem e a sua actividade têm vindo a afectar o ambiente natural., por exemplo, nos processos de *smog* fotoquímico, precipitação ácida e poluição de lençóis freáticos com nitratos. Por outro lado, a amónia desempenha um importante papel na formação de aerossóis atmosféricos e poderá ter sido um importante gás no efeito de estufa na atmosfera primordial (Sharma, 2005).

O azoto é também um elemento crucial nos processos biológicos fazendo parte da constituição de aminoácidos e proteínas, nucleótidos e ácidos nucleicos, clorofilas e coenzimas (Henry e Jefferies, 2002).

Apesar da grande disponibilidade de azoto molecular na atmosfera terrestre (cerca de 78%), muitos dos organismos vivos não conseguem usar directamente esta forma inorgânica como fonte de azoto. Apenas alguns microrganismos desenvolveram a

capacidade de converter o azoto atmosférico noutras formas de azoto que mais facilmente são utilizadas pelas células, através dum processo conhecido como fixação de azoto. Este é realizado por relativamente poucas espécies bacterianas de vida livre ou simbioses (Raven et al., 2005).

As etapas essenciais no ciclo do azoto são a fixação, a amonificação, a nitrificação, a assimilação e a desnitrificação do azoto (Figura 1) (Mauseth, 2003).

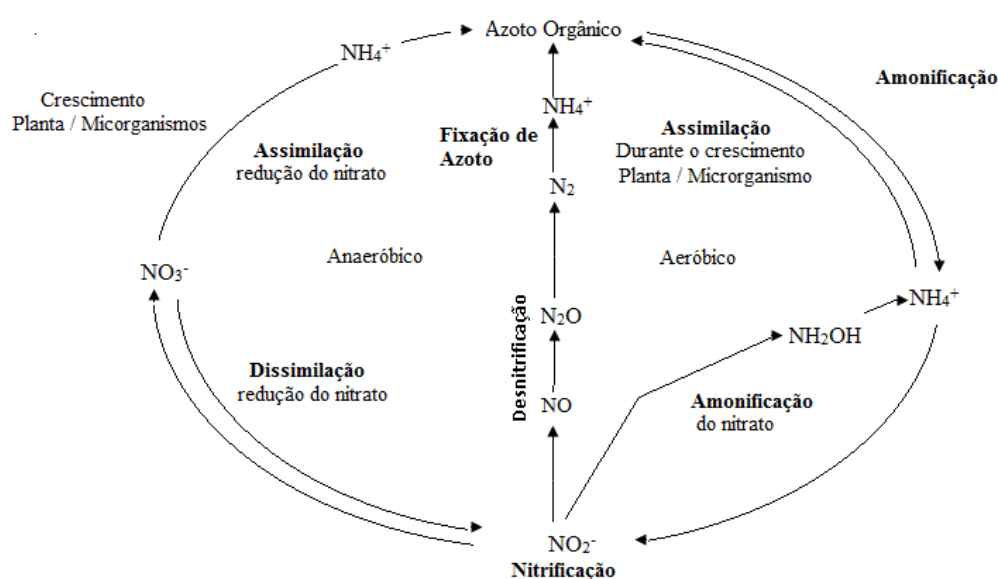


Figura 1. Ciclo do azoto no ecossistema terrestre (adaptado de Sharma, 2005).

A fixação de azoto é um processo complexo, intensamente energético (Duc et al., 2009) pelo qual o gás dinitrogénio (N_2) é reduzido ao ião amónio (NH_4^+), tornando-se disponível para reacções de aminação, processo pelo qual iões de amónio são transferidos para compostos de carbono, produzindo aminoácidos e outros compostos orgânicos contendo azoto (Raven et al., 2005). Proteínas, aminoácidos e iões amónio podem posteriormente ser usados como fonte de azoto para muitos organismos que não têm capacidade de assimilar directamente o azoto atmosférico (Sharma, 2005).

A fixação do azoto atmosférico depende de um sistema enzimático – a nitrogenase – composto pela nitrogenase e nitrogenase reductase. O centro activo desta enzima, onde ocorre a redução do azoto está normalmente associado a molibdénio e ferro (funcionando como cofactores). Este processo necessita de energia (16 mol de ATP/1mol de N_2 fixado), dependendo consequentemente da disponibilidade de altos

níveis de matéria orgânica para produção de ATP através da respiração aeróbia (Welsh, 2000).

No solo, a fixação de azoto atmosférico ocorre por acção de bactérias de vida livre (género *Azotobacter*, *Azomonas*) e/ou que vivem de modo simbiótico com plantas (género *Rhizobium*) (Raven et al., 2005).

A amonificação é um processo em que o excesso de azoto resultante da degradação de matéria orgânica morta por bactérias saprófitas e fungos é transformado em iões amónio (Raven et al., 2005).

A nitrificação envolve dois tipos de bactérias, as bactérias que oxidam amónia a nitrito (géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*) e as bactérias que oxidam nitrito a nitrato (géneros *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*). As enzimas chave envolvidas neste processo são a amónia monoxigenase (AMO) e hidroxilamina oxirredutase (HAO) (Bothe et al., 2000).

O nitrito formado no solo é tóxico para as plantas mas, normalmente não se acumula porque rapidamente é convertido a nitrato, que é posteriormente absorvido pelas plantas.

O nitrato ao ser absorvido pelas células das plantas é reduzido a ião amónio, num processo que requer energia. Posteriormente, este último composto é transferido para compostos contendo carbono para produzir aminoácidos e outros compostos orgânicos que contêm azoto, por um processo designado de assimilação (Raven et al., 2005). A assimilação de azoto ocorre normalmente nas raízes, local onde a absorção de nitrato ou amónio é maior (Mauseth, 2003).

A desnitrificação é um processo resultante da actividade microbiana e consiste em reduções sucessivas a partir do nitrato via nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso até obtenção de azoto molecular que é libertado para a atmosfera. Envolve bactérias desnitrificantes presentes nos solos (Bothe et al., 2000) como espécies de *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Spirillum*, *Thiobacillus* e *Bacillus* (Sharma, 2005).

1.2 - Comunidades microbianas na rizosfera

A rizosfera é a porção do solo onde microrganismos medeiam processos sob influência do sistema radicular (Berg e Smalla, 2009). Difere do restante solo por apresentar uma elevada biomassa e actividade microbiana, devido à exsudação das raízes, fenómeno conhecido como efeito da rizosfera (Berg e Smalla, 2009). As suas propriedades químicas devem-se à absorção diferencial de nutrientes pelas raízes, por grupos específicos de bactérias e por mudanças de pH resultante dessa mesma absorção e actividades metabólicas associadas (Jones et al., 2003).

As interacções entre plantas e microrganismos presentes na rizosfera são importantes para compreender processos tais como ciclos de nutrientes, funcionamento de ecossistemas e sequestração de carbono (Singh et al., 2004).

Os exsudados da raiz consistem normalmente em hidratos de carbono, ácidos orgânicos, aminoácidos, amidas, vitaminas e outros compostos. A quantidade e a composição dos exsudados da raiz que chegam ao solo são variáveis dependendo da espécie da planta, da sua idade e fase do ciclo de vida, do seu estado nutricional, e também das condições ambientais (Hines et al., 1999). Uma importante fracção (64-86%) do carbono libertado na rizosfera é utilizada por microrganismos, resultando num aumento da densidade das comunidades microbianas de uma ou mais ordens de grandeza relativamente ao solo não directamente influenciado pelas raízes (Burgmann et al., 2005). Não são somente as interacções planta-microrganismos que são importantes para a determinação da composição das comunidades microbianas na rizosfera. Também os microrganismos podem influenciar-se e seleccionar-se entre si através de relações de transferência de materiais ou energia ou por relações de antagonismo (Weller, 1988; Lugtenberg et al., 2002).

O efeito das plantas sobre as comunidades microbianas no solo é exercido de forma endógena, através dos exsudados produzidos pela raiz. Os exsudados fornecem nutrientes para os microrganismos mas, simultaneamente, contêm também metabolitos antimicrobianos específicos que exercem um efeito selectivo sobre as populações microbianas da rizosfera (Figura 2).

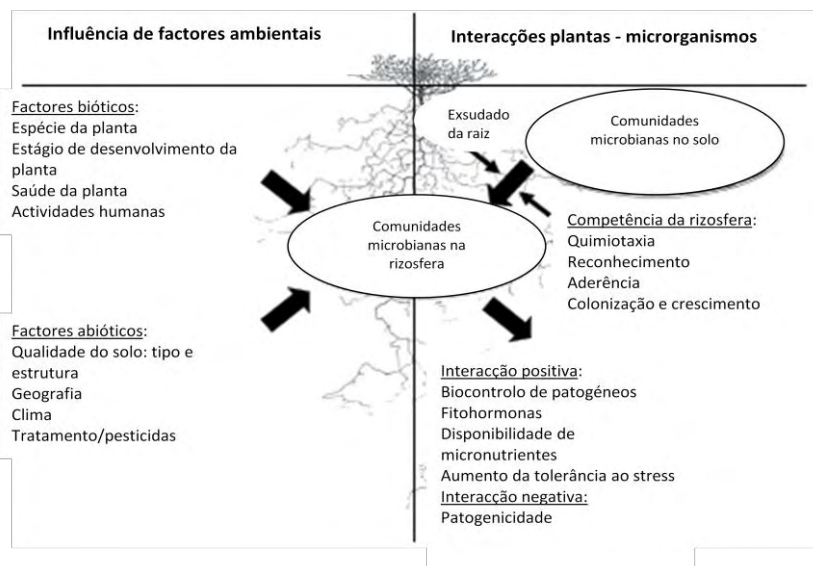


Figura 2. Factores que influenciam as comunidades microbianas da rizosfera e modelo de como as comunidades microbianas são seleccionadas no solo: pelos exsudados das raízes e competência da rizosfera (adaptado de Berg e Smalla, 2009)

Em sedimentos pobres em nutrientes, como os de sapal., verifica-se a existência de plantas com porções subterrâneas bem desenvolvidas formando rizomas, de modo a criarem uma superfície dinâmica, bioquimicamente capaz de suportar diferentes gradientes químicos para desenvolvimento de microflora (Gomes et al., 2001).

Os exsudados radiculares influenciam o crescimento e a diversidade das comunidades bacterianas e estas, por sua vez, influenciam a disponibilidade de substratos no solo (Gomes et al., 2001). Ou seja, os exsudados radiculares libertam sinais químicos simbióticos que atraem microrganismos do solo envolvidos na aquisição de nutrientes, de modo a compensar parcialmente a carência nutricional e favorecendo o crescimento da planta (Berg e Smalla, 2009).

Sabe-se que as comunidades bacterianas da rizosfera dos sedimentos do sapal estão envolvidas em inúmeros processos, tais como, decomposição da matéria orgânica, (Smith et al., 1993), regeneração de nutrientes inorgânicos (Dudley et al., 2001) e transformação de poluentes (Compeau et al., 1985). São reguladas por factores como a vegetação, o encharcamento do sapal., a textura do sedimento, a salinidade, a disponibilidade de aceptadores de electrões, assim como a temperatura e o pH (LaRoque et al., 2004).

Neste tipo de sedimentos detectam-se grandes actividades enzimáticas extracelulares associadas aos microrganismos envolvidos nos ciclos do carbono, azoto,

fósforo e sulfato. Por exemplo, a β -glucosidase e celulase estão associadas à degradação e decomposição da matéria orgânica (Sinsabaugh, 1994). As enzimas fosfatases tornam disponível o fósforo para a nutrição da planta (Morra, 2005) e enzimas como o complexo nitrogenase tornam disponível o azoto no solo para ser incorporado na biomassa da planta (Welsh, 2000).

Sedimentos com défices em azoto levam a um maior desenvolvimento de bactérias fixadoras de azoto, através da libertação de exsudados pela raiz que as atrai, ou através de um processo de pressão selectiva, uma vez que sendo a disponibilidade de azoto um factor limitante para o desenvolvimento de alguns microrganismos, as bactérias diazotróficas assumem vantagem (Burgmann et al., 2005).

Além de fornecerem azoto para promover o crescimento da planta, as bactérias diazotróficas afectam também o desenvolvimento das plantas por outros mecanismos como a síntese de fitohormonas ou competição com outros microrganismos patogénicos (Burgmann et al., 2005).

1.2.1 - Bactérias fixadoras de azoto - Nitrogenase

Em ecossistemas naturais a fixação de azoto atmosférico é a mais importante fonte de azoto para os sedimentos. Estima-se que bactérias fixadoras de azoto de vida livre no solo contribuem com uma quantidade de azoto de 0-60 kg ha⁻¹ ano⁻¹ (Burgmann et al., 2004). A sua capacidade de fixação varia de acordo com as disponibilidades de carbono, azoto e pressão parcial de oxigénio no solo (Burgmann et al., 2004).

Os organismos que fixam azoto dependem da actividade de uma enzima complexa que reduz o dinitrogénio (N₂) a amónia (NH₃) – a nitrogenase, uma metaloproteína codificada pelos operões nifHDK, vnfH-vnfDGK ou anfHDGK (Man-Aharonovich et al., 2007).

De um modo geral., esta enzima é constituída por uma dinitrogenase redutase ligada a um ião ferro, codificada pelo gene nifH (Fe – proteína) e uma dinitrogenase ligada a um ião ferro, que geralmente contém molibdénio e que é composta por duas subunidades (MoFe – proteína, $\alpha_2\beta_2$) codificadas pelos genes nifD e nifK (Mohamed, et al., 2008). As duas subunidades α catalisam a redução do azoto a amónia (NH₃), numa

reacção dependente de ATP, com as duas subunidades β a mediar o acoplamento da hidrólise de ATP com a transferência de electrões (Welsh, 2000).

Azotobacter vinelandii, uma bactéria aeróbia fixadora de azoto que vive livre no solo, foi a primeira diazotrófica em que se demonstrou a existência de três distintas nitrogenases: a nitrogenase contendo molibdénio (Mo-nitrogenase ou nitrogenase 1), a nitrogenase contendo vanádio (Va-nitrogenase ou nitrogenase 2) e a nitrogenase só contendo o ião ferro (nitrogenase 3) (Loveless et al., 1999).

A nitrogenase 1 é expressa na presença de molibdénio e consiste numa enzima complexa constituída pela dinitrogenase reductase 1 e dinitrogenase 1, estando os genes estruturais que a codificam organizados no operão *nifHDK*. A dinitrogenase reductase 1 é uma enzima homodimérica (codificada pelo gene *nifH*), constituída pelas subunidades α e β codificadas pelos genes *nifD* e *nifK*, respectivamente (Glazer e Kechris, 2009) (Figura 3).

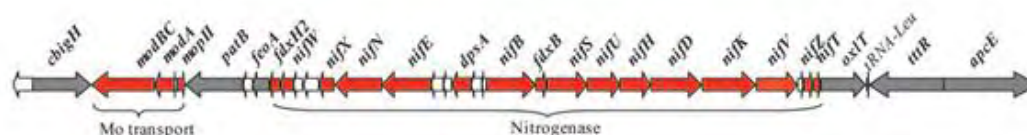


Figura 3. Genes envolvidos na fixação de azoto (setas a vermelho) (adaptado de Steunou et al., 2006)

A nitrogenase 2 é sintetizada por bactérias diazotróficas quando o molibdénio está ausente, mas está presente vanádio. Esta enzima complexa é constituída pela dinitrogenase reductase 2 e dinitrogenase 2. Os genes estruturais que a codificam estão organizados nos operões *vnfHFD* e *vnfDGK*. O gene *vnfH* codifica uma proteína ferredoxina que é necessária para a nitrogenase 2 e para o crescimento das bactérias diazotróficas. O operão *vnfDGK* codifica as subunidades da dinitrogenase 2: o gene *vnfD* codifica a subunidade α , o gene *vnfK* codifica a subunidade β e o gene *vnfG* codifica a pequena subunidade δ (Glazer e Kechris, 2009).

A nitrogenase 3 é sintetizada na ausência de molibdénio e vanádio, sendo constituída pela dinitrogenase reductase 3 e a dinitrogenase 3. Os genes estruturais que a codificam estão organizados no operão *anfHDGKOR*. O gene *anfH* codifica as subunidades da dinitrogenase reductase 3, enquanto os genes *anfD* e *anfK* codificam as subunidades α e β da dinitrogenase 3, respectivamente. O gene *anfG* codifica a

subunidade δ . Os genes *anfO* e *anfR* estão localizados imediatamente a jusante de *anfK* e são co-transcritos com os genes *anfDGK* num RNA mensageiro policistrónico. Sabe-se apenas que estes genes são necessários para a fixação de azoto na ausência de molibdénio e vanádio, mas a sua função ainda não está bem definida (Betancourt et al., 2008).

As bactérias diazotróficas representam um grupo funcional fisiologicamente e filogeneticamente diverso. O gene funcional *nifH* (nitrogenase reductase) tem sido usado como um marcador genético valioso na detecção e identificação destas bactérias. Este gene apresenta uma grande homologia com os genes *vnfH* e *anfH* (Glazer e Kechris, 2009).

A pesquisa dos genes *nifH* por si só não proporciona evidência definitiva da fixação activa de azoto, considerando-se a detecção de mRNA do *nifH* um melhor indicador da actividade real da nitrogenase (Burgmann et al., 2005), uma vez que o gene estrutural *nifH* pode estar presente no genoma do microrganismo e não ser expresso (Burgmann et al., 2005).

Para o estudo da diversidade e funcionamento das comunidades bacterianas envolvidas na fixação de azoto em solos e sedimentos têm sido propostos novos métodos de análise molecular que complementam a informação obtida por métodos dependentes de cultivo. Estudos recentes empregam a análise da diversidade do gene *nifH* por técnicas como o DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) com o intuito de caracterizar a diazotrofia em ambiente terrestre e aquático (Lovell et al., 2008).

1.3 - Diazotrofia em sedimentos do Sapal

Um dos principais objectivos de muitos dos estudos sobre bactérias diazotróficas em ambientes naturais é o melhor entendimento do processo de fixação de azoto e do seu papel no crescimento das plantas, como forma de otimizar culturas com interesse agrícola (Engelhard et al., 2000). Para tal têm-se desenvolvido estudos sobre: produtividade de plantas tolerantes ao sal como *Salicornia bigelovii*, em zonas áridas contaminadas com sal onde o nível de precipitação é reduzido (Rueda-Puente et al., 2003); avaliação da produtividade de *Leptochloa fusca* (L.) em áreas tropicais e

subtropicais na Austrália e África, em que o solo é salino e alcalino, com baixa fertilidade (Andrade et al., 1997); plantas pioneiras em glaciares (Duc et al., 2009).

Assim, o estudo de plantas que conseguem colonizar habitats inóspitos onde os níveis de azoto no solo estão diminuídos e onde a fixação de azoto é crucial para o desenvolvimento da biomassa da própria planta, revestem-se de particular interesse (Engelhard et al., 2000).

Os sapais marítimos correspondem a áreas de transição entre o meio terrestre e o meio marinho, desenvolvendo-se ao longo da costa e no interior dos estuários (Flowers et al., 1977), tendo sido definidos por Pritchard (1967) como corpos de água semi-rodados por terra que fazem conexão directa com o mar e onde a água do mar é significativamente diluída por água do rio.

Estes ambientes são bastante dinâmicos, sofrendo uma grande variedade de processos físicos, geológicos, químicos e biológicos (Joye e Pearl, 1993). Caracterizam-se por estarem sujeitos a forte instabilidade de factores ambientais como a temperatura, a salinidade, o teor de oxigénio dissolvido, a concentração de substâncias orgânicas, nutrientes e grau de turvação (Reboredo, 1988).

As fontes naturais de nutrientes e matéria orgânica são as zonas costeiras adjacentes, a drenagem que ocorre a partir das margens, a precipitação e os fluxos de água-doce que aí desembocam (Vernberg, 1993).

Os sistemas estuarinos podem sofrer a acção de constantes descargas de origem antropogénica como esgotos urbanos, actividade agrícola e industrial., que contribuem para o aumento significativo da concentração de matéria-orgânica e para a acumulação de nutrientes e de diversos tipos de contaminantes (Ogilvie et al., 1997).

Os sapais são ecossistemas de extrema importância económica e ecológica (Constanza et al., 1997) por: serem habitats para muitas espécies de organismos vivos, (incluindo espécies comercialmente importantes); diminuírem os efeitos das ondas, auxiliando no controlo da inundação e erosão (Feagin et al., 2009); melhorarem a qualidade da água nas zonas costeiras filtrando e retendo poluentes, removerem o excesso de nutrientes e diminuírem a concentração de microrganismos potencialmente patogénicos. Adicionalmente, estes habitats são usados para fins recreativos e educacionais (Vernberg, 1993).

Estas áreas são colonizadas por plantas vasculares, herbáceas, subarbustivas ou arbustivas (vegetação halófita) são uma fonte importante de nutrientes (carbono, azoto),

suportam uma extensa cadeia alimentar, funcionam como sistemas filtradores e de retenção de uma variedade de elementos e compostos poluentes (Allen e Pye, 1992).

Os sapais originam-se em zonas costeiras com baixos fluxos de maré, onde ocorre deposição de detritos e sedimentos em suspensão, surgindo bancos de vasa que proporcionam substrato para a vegetação (Verneberg, 1993).

A colonização é iniciada por espécies pioneiras como as gramíneas do género *Spartina* que suportam longos períodos de submersão e, por isso mesmo, se instalam nas zonas de mais baixa cota (Verneberg, 1993).

Uma vez estabelecida, a vegetação começa a amortecer a força da corrente e a sedimentação acelera-se. Ao mesmo tempo, vai retirando humidade às vasas através do sistema radicular, contribuindo para a sua consolidação (Adam, 1993).

Em zonas onde o substrato é menos resistente, a acção erosiva das águas forma os típicos canais que sulcam o sapal. A contínua acumulação de sedimentos eleva progressivamente o nível dos fundos, com a consequente redução de tempo de submersão e do teor salino. Estas alterações levam a modificações graduais na vegetação, numa sucessão que vai originar a zonação característica dos sapais (Adam, 1993) (Figura 4).

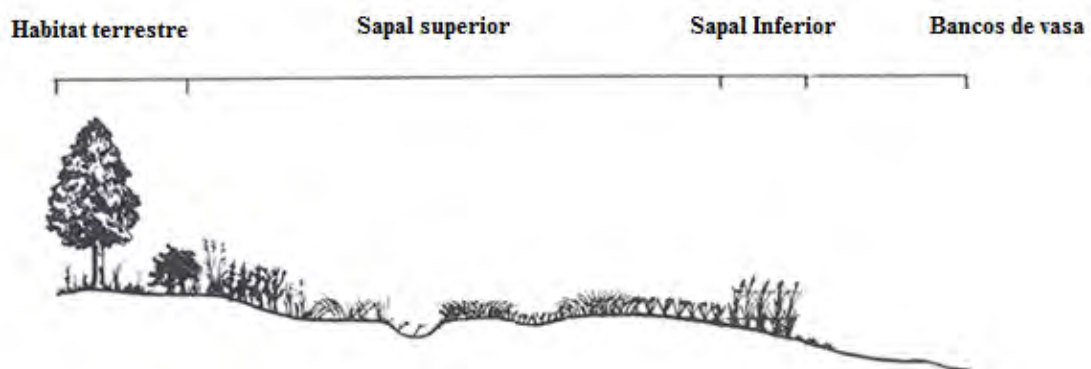


Figura 4. Perfil de um sapal (adaptado de Purinton e Mountain, 1998)

A distribuição da vegetação depende da inundação associada aos ciclos de maré, definindo-se o sapal inferior nas zonas mais baixas, inundadas mais frequentemente e por períodos mais longos, e o sapal superior nas zonas mais altas, menos frequentemente inundadas e por períodos mais curtos (Rozema et al., 1985).

Os sedimentos dos sapais contribuem também para a determinação das comunidades bacterianas presentes, devido à própria composição do sedimento em material orgânico (detritos vegetais) depositado sobre uma camada impermeável de argila (Córdova-Kreylos et al., 2006).

As comunidades microbianas presentes no sedimento decompõem a matéria orgânica, transformam poluentes, podem afectar as disponibilidades de metais pesados e ainda executar outras funções no ecossistema (Córdova-Kreylos et al., 2006).

Os sapais incluem-se entre os ecossistemas mais produtivos apresentando elevadas taxas de fixação de carbono ($1000\text{g de C.m}^{-2}\text{ano}^{-1}$) (Schubauer e Hopkins, 1984). A taxa de oxidação do carbono orgânico, por sua vez, é bastante alta nas camadas mais superficiais do sedimento, envolvendo processos como a respiração aeróbia, redução de sulfato e a redução de ferro (Koretsky et al., 2005).

O aumento da concentração de carbono orgânico e inorgânico, azoto e fósforo, bem como o aumento da biomassa microbiana, da actividade enzimática, da taxa de nitrificação e de desnitrificação, e as alterações dos processos de transporte de nutrientes entre o sedimento e a coluna de água são alguns dos sinais de eutrofização num sapal (Meyer-Reil e Köster, 2000; Costa, 2007).

1.3.1- Vegetação do sapal

Desde há várias décadas que a vegetação do sapal é vista como uma alternativa interessante para a remediação de locais sujeitos aos efeitos da poluição, porque é capaz de controlar a remoção de azoto e ainda retardar os fluxos de água prolongando o tempo de residência e o tempo de reacção do azoto, fornecendo matéria orgânica e promovendo o crescimento de muitos microrganismos no compartimento sedimentar. A submersão e emersão destes locais proporcionam o abastecimento de oxigénio o que

explica o crescimento de bactérias em biofilmes na superfície das plantas e na sua rizosfera (Ruiz-Rueda et al., 2009).

As plantas halófitas constituem recursos vegetais promissores para o desenvolvimento e melhoramento ambiental de zonas costeiras, por causa da sua elevada tolerância às condições salinas e de aspectos economicamente interessantes na sua composição (Rueda – Puente, 2003).

Salicornia bigelovii por exemplo, foi identificada como uma nova e promissora cultura com elevado potencial agro-industrial devido à sua alta qualidade oleaginosa. Apesar de crescerem em condições salinas, as plantas do sapal apresentam uma produtividade limitada pela quantidade de azoto disponível nos sedimentos. O estudo de comunidades diazotróficas associadas à sua rizosfera tornou-se ainda mais relevante face ao objectivo de desenvolver biofertilizantes para estes meios salinos, de modo a enriquecer naturalmente os sedimentos em fontes de nutrientes inorgânicos (Rueda – Puente, 2003).

A vegetação de um sapal tem uma baixa diversidade em termos de espécies e géneros apresentando, no entanto, características bem adaptadas ao habitat onde se desenvolve (Adam, 1993).

As halófitas são plantas adaptadas à salinidade elevada e variável, conseguindo completar o ciclo de vida em concentrações de aproximadamente 200mM de NaCl.

O controlo do seu crescimento está intimamente dependente de um complexo conjunto de factores interligados, como sejam a salinidade, deficiências nutricionais, ambiente redutor, encharcamento, acumulação de sulfuretos, mudanças climáticas, erosão e sedimentação provocadas pela acção das marés (Ungar, 1991).

1.3.1.1 – Factores de stress nas halófitas: salinidade e encharcamento

A salinidade e o encharcamento são os factores chave na distribuição da vegetação de um sapal (Flowers e Colmer, 2008).

A tolerância à salinidade é controlada pela absorção e compartimentação de iões tais como, sódio, potássio, cloro e pela síntese de solutos orgânicos compatíveis. Adicionalmente, algumas espécies possuem glândulas salinas, que permitem a excreção

de sal, ajudando a manter as concentrações iónicas constantes (Flowers e Colmer, 2008).

Habitualmente, sódio e cloro são compartimentados em vacúolos ao mesmo tempo que os solutos osmoticamente compatíveis como sacarose, sorbitol, prolina, metilprolina, compostos quaternários de amónia e glicinabetaína são produzidos e acumulados no citoplasma (Flowers e Colmer, 2008).

O encharcamento, à semelhança da salinidade, é um factor de stress para o crescimento das halófitas. Quando submersas, as plantas sofrem privação de oxigénio, o que resulta em défices energéticos que podem comprometer o transporte de iões (Colmer e Flowers, 2008).

A acumulação de iões e outros compostos, tais como, dióxido de carbono, etileno, Fe^{2+} , Mn^{2+} , S^{2-} e ácidos carboxílicos, vão influenciar o crescimento das plantas e colocar em causa a tolerância à salinidade (Colmer e Flowers, 2008). A submersão completa diminui o acesso ao oxigénio, mas também a fotossíntese é negativamente afectada pela baixa disponibilidade de dióxido de carbono e de luz. A resposta ao encharcamento depende da sua duração e dos danos causados. A sobrevivência da planta pode envolver a produção de raízes adventícias contendo aerênquima, que permite um suplemento interno de oxigénio (Colmer e Flowers, 2008).

1.3.1.2 – Défices nutricionais

A salinidade interfere com a absorção de nutrientes pela planta. Apesar do sedimento poder influenciar a absorção e translocação dos nutrientes, a salinidade diminui a absorção de nutrientes disponíveis por competição com iões sódio e cloro. O sódio pode causar défices na absorção de cálcio e potássio, e o cloro na captação de iões nitrato, iões normalmente incorporados na biomassa da planta (Grattan e Grieve, 1994).

Em ambientes salinos a presença de sódio e cloro excede a concentração de outros iões presentes no sedimento, diminuindo a capacidade de absorção dos outros iões pelas plantas. A disponibilidade de iões depende da sua actividade na solução do solo, que por sua vez depende do pH, do potencial redox (Eh), e de outros inúmeros factores ambientais (Grattan e Grieve, 1994).

Um dos nutrientes cujo défice influencia o crescimento das plantas é o azoto. As principais fontes de azoto no solo são iões amónio e iões nitrato, cuja disponibilidade e absorção é, por sua vez, influenciada pela salinidade (Salsac et al., 1987).

O ião amónio é transportado de modo passivo para o interior das células da planta, entrando a favor do gradiente eléctrico transmembranar. Não se acumula nas células devido à presença de uma enzima designada de glutamina sintetase, que assegura a sua eliminação como espécie iónica, promovendo a libertação de um protão do ião amónio. As ATPases da membrana vão funcionar como bombas protão que asseguram a eliminação dos protões para o ambiente externo. A absorção do ião nitrato, por sua vez, ocorre de modo activo, sendo rapidamente acumulado em grandes quantidades nos vacúolos, que funcionam como reserva e contribuem para o equilíbrio osmótico da planta (Salsac et al., 1987).

O NaCl interfere com a absorção de azoto inorgânico, inibe o processo de nitrificação e ainda a absorção de nitratos pelas raízes das plantas na presença de iões cloro. Por outro lado, sabe-se que a nitrato reductase é estimulada na presença de cloreto de sódio que, subsequentemente, vai promover a assimilação do nitrato como fonte de azoto, para ser incorporado na formação de proteínas na planta (regulando o equilíbrio osmótico) (Stewart et al., 1973).

A absorção de aminoácidos livres do solo pode ser uma alternativa à fixação de azoto. No entanto, a sua disponibilidade é limitada e ainda pouco se sabe sobre este processo (Henry e Jefferies, 2002).

Apesar dos défices nutricionais de azoto em solos salinos, sabe-se que os sapais são ecossistemas produtivos. Com base nisto, tornou-se necessário o estudo de grupos bacterianos funcionais na rizosfera de halófitas que estão envolvidos na fixação de azoto, de modo a compreendermos o envolvimento deste grupo de bactérias na produção da biomassa das plantas (Ruiz-Rueda et al., 2009).

1.3.2 – Metabolismo da vegetação halófitas

A vegetação halófitas dominante num sapal inclui grupos metabólicos diferentes, no que diz respeito ao metabolismo da fixação do CO_2 no processo fotossintético. Desta forma *Spartina* apresenta um metabolismo em C_4 , *Halimione* metabolismo em C_3 , (Burke et al., 2002; Akhani et al., 1997) e *Sarcocornia* metabolismo CAM, (Raven et al., 2005).

Plantas com metabolismo em C_3 assimilam o CO_2 sob a acção da ribulose 1,5-bifosfato – carboxilase (RuBP – carboxilase) e o produto da fixação é o fosfoglicerato (PGA) que contém 3 átomos de carbono (Osborne et al., 2006).

As plantas com metabolismo em C_4 assimilam o CO_2 sob a acção da enzima fosfoenolpiruvato-carboxilase (PEP-carboxilase), que fixa o CO_2 ao fosfoenolpiruvato (PEP) formando-se um ácido orgânico com 4 átomos de carbono (Osborne et al., 2006).

O metabolismo CAM é praticamente idêntico ao metabolismo em C_4 : o PEP (fosfoenolpiruvato) é carboxilado formando oxaloacetato, que é posteriormente reduzido a malato ou a outros ácidos. Estes ácidos não são transportados mas sim acumulados. O processo ocorre durante a noite.

Neste tipo de metabolismo, os estomas mantêm-se fechados nos períodos mais quentes e abrem-se apenas à noite quando está frio. Apesar da abertura dos estomas durante a noite permitir a conservação de água na planta, a falta de energia luminosa cria problemas na fotossíntese: a planta não pode armazenar ATP e NADPH durante o dia para utilizar à noite. Estes compostos por sua vez, não suficientemente estáveis por longos períodos de tempo (Raven et al., 2005).

Plantas com metabolismo CAM e C_4 têm vantagens sobre plantas com metabolismo em C_3 : alta taxa fotossintética, elevada eficiência na utilização de água e elevada tolerância à salinidade. A desvantagem é o alto custo energético para a fixação de CO_2 (5 ATP's por cada molécula de CO_2 fixada) (Raven et al., 2005). Plantas com metabolismo em C_4 são altamente produtivas, ao contrário de plantas com metabolismo CAM que são muito menos produtivas do que as C_3 (Mauseth, 2003).

1.4 – Ria de Aveiro

A Ria de Aveiro é uma vasta área lagunar situada no noroeste da Península Ibérica na costa litoral Atlântica, separada do mar por um estreito cordão arenoso. É um sistema complexo caracterizado por uma intrincada rede de canais estreitos e zonas intertidais. Tem aproximadamente 45Km de comprimento e 8,5Km de largura, com uma área total de 11000 ha. Durante as marés vivas, a área alagada é de 83Km² em maré-alta e 66Km² em maré-baixa. A amplitude das marés varia entre 0,6m em marés mortas e 3,2m em marés vivas, com uma amplitude média de cerca de 2m (Santos et al., 2007).

Constitui um multi-ecossistema estuarino que troca água com o oceano (aproximadamente 89Mm³), enquanto que a média de entrada de água fresca num ciclo de marés é de 1,8Mm³. As suas principais fontes de contaminação são as águas residuais da cidade de Aveiro e poluentes resultantes de actividades industriais, aquicultura e escorrência dos campos agrícolas. Este tipo de contaminações tem resultado na significativa eutrofização do sistema (Henriques et al., 2004).

Os sapais representam áreas importantes das zonas intertidais, principalmente nas zonas centro e norte do sistema estuarino. A vegetação do sapal consiste principalmente em *Halimione portucaloides* (L.) Aellen, *Sarcocornia perennis* (Miller) A.J.Schott subsp. *Perennis*, *Salicornia ramosissima* J.Woods, *Juncus maritimus* Lam. e *Limonium vulgare* (Miller) (Silva, 2000).

1.4.1 - *Halimione portucaloides*

Halimione portucaloides é um subarbusto da família Chenopodiaceae, comum em solos salinos inundados frequentemente (Figura 5) (Redondo-Gomez et al., 2007). O seu crescimento é sensível à temperatura (Almeida et al., 2008).

Apresenta uma base lenhosa e a parte superior herbácea, caules com folhas opostas e flores unissexuais (Castroviejo et al., 1990). Floresce no final do Verão e durante o Outono (Waisel, 1972).

É uma espécie que frequentemente domina o sapal superior, rodeando canais, sujeita a variações de salinidade e crescendo em solos com baixa disponibilidade de azoto (Redondo-Gomez et al., 2007).

Apresenta uma boa capacidade adaptativa em ambientes salinos, devido à sua suculência e desenvolvimento de tricomas vesiculares nas suas folhas. Mais de 50% do cloreto de sódio é transportado pelo caule até às folhas, para ser acumulado nos vacúolos dos tricomas vesiculares, e de seguida excretado como consequência do colapso da sua célula vesicular (Freitas et al., 1993).



Figura 5. *Halimione portucaloides*

1.4.2 – *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*

Sarcocornia perennis subsp. *perennis* é um subarbusto da família Chenopodiaceae, comum em solos salinos inundados frequentemente (Figura 6). Apresenta caules carnudos e articulados, com folhas opostas reduzidas a pequeníssimas escamas e dispostas no ápice de cada artículo fértil (Castroviejo et al., 1990; Bishop et al., 2006).

Esta espécie consegue manter-se em solos com baixo potencial redox, apresentando um balanço de carbono positivo em condições salinas (Bishop et al., 2006).

À semelhança de *Halimione portucaloides* coloniza sapais de zonas temperadas, com sedimentos ricos em metais (Almeida et al., 2008).



Figura 6. *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*

1.5 – Objectivos

O objectivo deste estudo foi testar a hipótese de que, decorrendo das interacções que se estabelecem entre plantas e microrganismos dos sedimentos, a abundância e diversidade das bactérias diazotróficas é aumentada na rizosfera das plantas de sapal. Para tal, quantificou-se a abundância de bactérias diazotróficas cultiváveis e caracterizou-se, por métodos independentes de cultivo, as comunidades microbianas associadas à rizosfera de duas plantas bem representadas nos sapais da Ria de Aveiro, *Halimione portucaloides* e *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*. Foi ainda feita a comparação de comunidades bacterianas associadas a sedimentos não colonizados, considerados como controlo.

A análise comparativa envolveu a caracterização das propriedades físico-químicas do sedimento, a concentração de nitratos nas plantas como factor condicionante da produção de biomassa, a análise da diversidade microbiana da comunidade total, a análise da diversidade dos isolados bacterianos potencialmente diazotróficos para o gene 16S rRNA e para o gene da nitrogenase (*nifH*) e sua identificação por sequenciação de rRNA 16S.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Área de estudo e amostragem

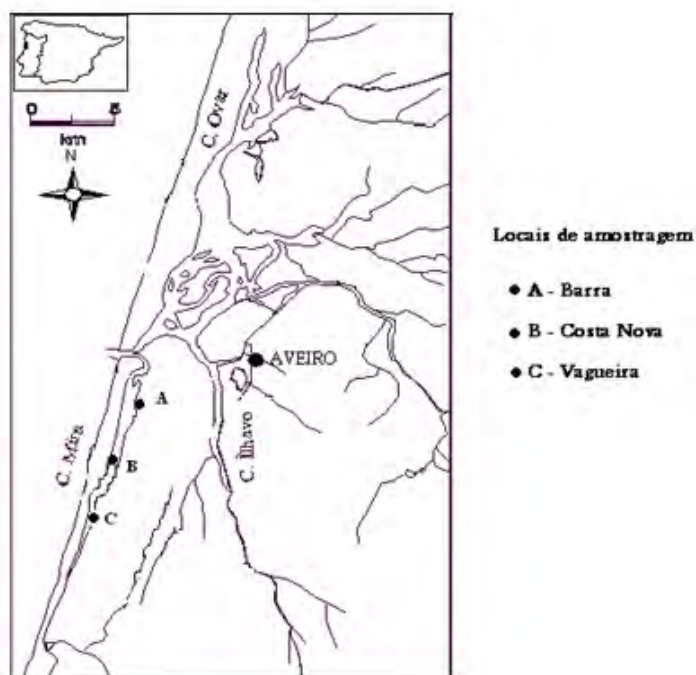


Figura 7. Ria de Aveiro (Portugal) – Os locais de amostragem estão assinalados com um círculo preto.

O estudo foi desenvolvido em zonas de sapal da Ria de Aveiro (Figura 7). Os principais canais da Ria são o canal de Mira, entendendo-se para Sul a partir da embocadura, o canal de Ovar, para Noroeste, o canal do Espinheiro para Nordeste e o canal de Ílhavo, para Sudeste. Foram seleccionados três locais de amostragem ao longo do canal de Mira de modo a representarem zonas do estuário com diferentes salinidades. O local Barra (A) situa-se a uma latitude N 36° 47' 26" e longitude W 02° 42' 35"; o local Costa Nova (B) situa-se a uma latitude N 40° 35' 49" e longitude W 08° 45' 02"; o local Vagueira (C) situa-se a uma latitude N 40° 33' 26" e longitude W 08° 45' 56".

As amostras de sedimento (para a análise das propriedades do sedimento, quantificação da abundância bacteriana, estudos moleculares das comunidades microbianas) e as amostras das plantas foram recolhidas em Novembro de 2008. As plantas e sedimentos da rizosfera foram colhidos com a ajuda de uma pá, em bancos monoespecíficos de *Halimione portucaloides* e *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*. Foram também colhidas amostras de sedimento sem vegetação, que foi considerado como controlo. Em cada local foram recolhidas quatro subamostras de *Halimione*

portucaloides, quatro subamostras de *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* e amostra de sedimento controlo.

A porção de sedimento aderente às raízes (rizosfera) foi imediatamente extraída e analisada de modo a determinar a abundância e diversidade microbiana. Essa extracção foi conseguida sacudindo as raízes das plantas de modo a libertar o sedimento não aderente às raízes, e reservando as raízes com solo aderente (rizosfera) em caixas de Petri estéreis.

O sedimento libertado pelo sacudir das raízes, foi colocado em sacos de plástico e conservado a -20°C até à realização da análise granulométrica e química.

As amostras das plantas foram devidamente limpas através de lavagens sucessivas com água destilada e seccionadas em raiz, caule e folhas. Cada fracção foi colocada em estufa a 40°C até completa secagem e armazenadas em sacos de papel, para posterior estudo do seu conteúdo em nitratos.

2.2 - Caracterização do sedimento

Os sedimentos não aderentes às raízes, das quatro subamostras de *Halimione portucaloides*, das quatro subamostras de *Sarcocornia perennis perennis* e amostra de sedimento controlo de cada um dos locais, foram sujeitos a caracterização química e granulométrica.

2.2.1 – Conteúdo em água

O conteúdo em água foi estimado a partir da relação peso seco e peso fresco do sedimento. Um grama de sedimento fresco foi sujeito a secagem a 60°C (Incubators TK 3064, EHRET) até obter um peso constante (Explorer Pro OHAUS Modelo EP413). Este parâmetro foi expresso em percentagem de peso fresco do sedimento.

2.2.2 – Salinidade, temperatura e potencial redox

A salinidade foi determinada com um condutivímetro (WTW, Modelo Cond 330i/set) a partir da água intersticial do sedimento, que foi recolhida por centrifugação (10000 x g IECB-22M Centrifuge) e filtrada através de uma membrana de acetato de celulose (GE Osmonics Labstore) com um poro de 0,45µm. O seu valor foi expresso em PSU.

A temperatura foi medida *in situ* com uma sonda (WTW, Modelo Cond 330i/set) e o seu valor foi expresso em graus centígrados (°C).

O potencial redox foi medido com um potenciómetro *in situ* (WTW 330/set), o seu valor foi expresso em milivoltes (mV).

2.2.3 – Matéria Orgânica

A matéria orgânica total foi estimada a partir da perda de peso por incineração. O sedimento previamente seco numa estufa (Ehret Incubators TK 3064), durante 12h a 60°C foi pesado (Explorer Pro OHAUS Modelo EP413) após arrefecimento num exsiccador e levado a incinerar numa mufla a 550°C durante 2h. A fracção resultante foi novamente pesada para a determinação do peso perdido do solo (LOI – *loss on ignition*) que foi expresso em percentagem de peso seco.

2.2.4 – Nutrientes: nitratos e nitritos

A concentração de nitrato foi determinada pelo método de Jones et al. (1984) e a concentração de nitrito foi determinada pelo procedimento descrito por Grasshof et al. (1983).

O processo de determinação da concentração de nitrato baseia-se na redução do nitrato a nitrito e subsequente determinação da concentração de nitrito.

A redução é desencadeada pela agitação das amostras de água intersticial com cádmio esponjoso, na presença de cloreto de amónia.

A concentração de nitrito é determinada por um método colorimétrico, em que um complexo diazotado de cor rosa, se forma após reacção dos nitritos com duas aminas aromáticas, a sulfanilamida e a N-(1-naftil) etilenodiamina.

Foram usados reagentes Merck e as leituras de absorvância foram feitas a 540nm num espectrofotómetro Thermo Spectronic (Genesys 10UV).

2.2.5 - Análise granulométrica

A análise granulométrica do sedimento foi realizada segundo Quintino et al. (1989).

Previamente o sedimento foi sujeito a uma lavagem com água destilada, soltando as partículas. Após algum tempo de repouso, removeu-se o material em suspensão e sujeitou-se o sedimento a destruição química da matéria orgânica através da adição de diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio (Merck).

Quando deixou de ocorrer reacção, adicionou-se água destilada, deixou-se repousar e removeram-se as partículas em suspensão.

A água foi decantada cuidadosamente e o sedimento seco na estufa (Incubators TK 3064, EHRET) a 60°C, até obtenção de um peso (Explorer Pro-OHAUS Modelo EP413) constante. De seguida, o sedimento foi agitado para soltar as partículas e passado por um crivo de 63 µm.

A fracção siltosa e argilosa (partículas com diâmetro abaixo de 0,063mm) foram expressas em percentagem do peso seco do sedimento total.

As partículas maiores foram novamente secas até obtenção de um peso constante e peneiradas através de uma bateria de crivos.

A fracção arenosa (0,063 – 4 mm) do sedimento foi classificada de acordo com o valor de ϕ mediano (ϕ_{50}), seguindo a escala de Wentworth (Doeglas, 1968), sendo ϕ o valor do \log_2 do diâmetro da partícula expresso em milímetros.

2.3 – Quantificação de nitratos na planta

A determinação da concentração de nitratos nas plantas foi efectuada segundo o método colorimétrico descrito por Cataldo et al. (1975). Este método baseia-se no facto de os nitratos formarem um composto amarelo, susceptível de quantificação colorimétrica (paranitrossalicilato de sódio), na presença de salicilato de sódio.

Para cada planta colhida, efectuou-se a pesagem (Explorer Pro-OHAUS Modelo EP413) de 100 mg do material da raiz, caule, folha/artículo previamente seco em estufa. De seguida, cada porção foi triturada e homogeneizada, e 10 mL de água destilada foram adicionados. Após permanecerem 1h na estufa (Incubators TK 3064, EHRET) a 45°C, as amostras foram agitadas e centrifugadas (IECB-22M Centrifuge) a 6500 rpm durante 10 min. Do sobrenadante obtido foram pipetados 200 µL para erlenmeyers de 50 mL, adicionando-se de seguida 800 µL de ácido salicílico a 5% em ácido sulfúrico concentrado (Merck). Após 20 minutos à temperatura ambiente, 19 mL de hidróxido de sódio 2N (Merck) foram adicionados lentamente para elevar o pH acima de 12. Após o arrefecimento das mesmas à temperatura ambiente, a absorvância das amostras a 410 nm foi determinada espectrofotometricamente (Thermo spectronic, Genesys 10UV) para um comprimento de onda de 410nm.

A concentração de nitratos nas amostras foi determinada por regressão linear a partir da recta de calibração obtida das leituras de absorvância das soluções padrão de nitrato (10, 20, 40, e 60µM de ião nitrato). Estas últimas foram preparadas a partir de uma solução de nitrato de potássio (Merck).

2.4 - Extracção de células microbianas do sedimento

Com o objectivo de avaliar a diversidade filogenética das comunidades microbianas do sedimento de diferentes bancos de vegetação, foi separado o sedimento aderente às raízes de quatro sub-amostras de cada espécie e uma amostra de sedimento controlo de cada local em estudo.

A extracção de células microbianas do sedimento foi realizada por agitação (Agitor B 300EB) (100 rpm) durante 5 minutos, colocando 5 g de amostra de sedimento num erlenmeyer contendo 5 g de pérolas de vidro estéreis (com 4 mm de diâmetro) e 45 mL de solução de extracção contendo Tween 80 (0,1%) e pirofosfato de sódio (0,1%).

Para recolher as células microbianas, 15 mL do sobrenadante da suspensão de cada amostra foram centrifugados -se (IECB-22M Centrifuge) e o pellet ressuspendido em etanol absoluto (97%) até um volume final de 1,5 mL. As suspensões de células foram conservadas a -20°C até à análise (Gomes et al., 2007).

O restante sobrenadante foi usado para o procedimento de cultivo e isolamento de bactérias diazotróficas.

2.5 - Isolamento e cultivo de bactérias diazotróficas do sedimento

O isolamento das bactérias diazotróficas foi feito em meio de Burk de acordo com o descrito por Park et al. (2005) tendo-se alterado apenas a concentração de agar para 0,8 %.

A sementeira foi feita por incorporação de 1 mL de sobrenadante resultante da extracção de células microbianas com meio de Burk e ainda incorporação de 1mL de diluições sucessivas do sobrenadante com meio de Burk.

Incubaram-se todas placas a 28°C (Hotcold_M_Selecta) durante 7 dias e procedeu-se a repicagem de colónias com características macroscópicas diferentes para meio de Burk com 1,5% de agar. O processo foi repetido por seis vezes consecutivas até à obtenção de culturas puras. A pureza das culturas foi confirmada por observação ao microscópio.

As culturas puras foram conservadas a -18°C em microtubos de 1,5mL, após lavagem do meio sólido com 2mL de uma solução que continha 20% de glicerol (Merck) e meio de Burk líquido (0,18%)

2.6 - Extracção de DNA de bactérias diazotróficas isoladas do sedimento

Para a extracção de DNA dos isolados conservados a -18°C, 10µL da suspensão foram inoculados em 500µL de meio de Burk líquido (0,18 % de agar) durante 12 horas, a 20°C, com agitação constante. O crescimento foi monitorizado por observação visual (turvação do meio).

Após a incubação, as culturas foram centrifugadas (Heraeus Pico 17 Centrifuge) durante 5 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl - Fluka, 1 mM de EDTA - Fluka, pH 8.0). De seguida, adicionou-se 50 µL de solução de lisozima (2mg ml⁻¹ - Fluka) foram adicionados e a mistura incubada a 37 °C (Hotcold_M_Selecta) durante 1 hora. Após a incubação, 50 µL de solução de lise (Kit de extracção de DNA; Genomic DNA purification Kit -Fermentas) foram adicionados, tendo-se seguido um período de incubação a 65 °C de 10 min. Posteriormente, 100 µL de clorofórmio foram adicionados aos microtubos, em seguida centrifugados durante 5 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi removido para um novo microtubo e os ácidos nucleicos precipitados por adição de 100 µL de isopropanol. O DNA foi lavado com 100 µL de etanol a 70%. Após centrifugação durante 5 minutos a 13000 rpm e secagem do *pellet* ao ar livre, O DNA foi ressuspenso em 40 µL de tampão TE. A qualidade do DNA extraído foi verificada por electroforese de 5 µL de amostra em gel de agarose 0,8% (Merck), com brometo de etídio (VWR), a 100V durante aproximadamente 20 minutos em tampão TAE (0,04M Tris- Acetato - 0,001M EDTA - pH 8,0 - Fluka), e subsequente visualização num transiluminador de UV (Benchtop UV). As amostras de DNA foram conservadas a - 20 °C.

2.7 - Caracterização molecular das estirpes bacterianas

Com o objectivo de identificar isolados idênticos que pudessem constituir clones, o DNA genómico de cada isolado foi sujeito a tipagem por BOX-PCR (Tação et al., 2005).

A mistura de reacção de 25 µL continha tampão PCR 1x (tampão PCR sem MgCl₂, Tampão PCR com (NH₄)₂SO₄, 1:1) (Fermentas), 3,0 mM MgCl₂ (Fermentas), dimetilsulfóxido a 5 %, 200 µM de desoxinucleosídeos trifosfato (Fermentas), 0,3 µM do primer, Taq polimerase 1U (Fermentas) e 50-100 ng de DNA molde purificado. Para gerar perfis de Box-PCR foi utilizado o primer BOXA1R (5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G -3'). Para a amplificação usou-se um termociclador (Bio-Rad Laboratories) seguindo um protocolo previamente descrito para este procedimento (Rademaker e Bruijn, 1997) com um passo inicial de desnaturação a 94 °C durante 7 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 min, emparelhamento a 53 °C durante 1 min, extensão a 65 °C durante 8 min e um passo de extensão final a 65 °C durante 16 min.

Os produtos de PCR foram separados por electroforese num gel de agarose a 1,5% (Merck), utilizando TAE (Tris- Acético-EDTA, 0,5 %) a 100 V durante 4 h. Os géis foram corados com brometo de etídeo (VWR) e fotografados (Canon Powershot G10).

Os padrões de bandas foram analisados com o software Diversity Database (Bio-rad Laboratories) e convertidos numa matriz binária de 2 dimensões. Matrizes de similaridade foram calculadas com o coeficiente de Dice. As análises das matrizes de similaridade foram efectuadas pelo método de UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*). A análise estatística foi feita no programa NTSYSpc2 do Windows (Rohlf, 1993).

2.7.1 – Detecção do gene *nif H* nos isolados bacterianos

Os isolados com perfis de Box-PCR distintos, foram sujeitos a amplificação do gene *nifH* por *nested* PCR.

No primeiro PCR usou-se os primers *nifH* for A (5'-GCIWTITAYGGNAARGGNGG-3') e *nifH* for rev. (5'-GCRTAIABNGCCATCATYT-3') (Burgmann et al., 2005). Cada mistura de reacção de 20 µL continha tampão KCl 1x (Fermentas), 2,0 mM MgCl₂ (Fermentas), albumina do soro bovino (BSA) 5 mgmL⁻¹, 200 µM de desoxinucleosídeos trifosfato (Fermentas), 2 µM de cada primer ((Thermo Scientific)) e Taq polimerase 1U (Fermentas), à qual foi adicionada 1 µL da solução de DNA molde. O protocolo de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 seg, emparelhamento a 54 °C por 8 seg, extensão a 74 °C por 10 seg e um passo de extensão final a 72 °C por 10 min.

Na segunda reacção de PCR usou-se os primers *nifH* for B (5'- CGI TGY GAY CCN AAV GCN GA-3') e *nif* for rev. (5'- GCRTAIABNGCCATCATYT-3') e um GC-clamp ligado à extremidade 5' do primer directo para aumentar a separação das bandas de DGGE na análise electroforética. Cada mistura de reacção de 25 µL continha tampão KCl 1x (Fermentas), 2,0 mM MgCl₂ (Fermentas), BSA 0,3 mg.mL⁻¹, 200 µM de desoxinucleosídeos trifosfato (Fermentas), 1 µM de cada primer (Thermo Scientific) e Taq polimerase 1U (Fermentas), à qual foi adicionada 1 µL da solução de DNA molde, proveniente do produto da primeira reacção de PCR. O protocolo de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 11 seg emparelhamento a 51 °C por 8 seg, extensão a 74 °C por 10 seg e um passo de extensão final a 72 °C por 10 min. As reacções de PCR foram realizadas num termociclador MultigeneTM Gradient Thermal Cycler (Labnet International., Inc.).

Os produtos de PCR foram observados num gel de agarose (Merck) com TAE 1,5 % (0,04M Tris- Acetato - 0,001M EDTA - pH 8,0 - Fluka) com 8 µL de brometo de etídeo (VWR) para detectar a presença de produtos de amplificação.

2.7.2 – Amplificação do gene 16S rRNA

Os isolados bacterianos com amplificação para o gene *nifH* foram submetidos a amplificação do gene que codifica o 16S rRNA usando os primers 27F e 1494L (Costa et al., 2006).

Para as reacções de PCR usou-se os primers U27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e 1494L (5'- CTA CGG (RTA) CCT TGT TAC GAC-3') (Costa et al., 2006).

Cada mistura de reacção de 25 µL continha tampão KCl 1x (Fermentas), 3,75 mM MgCl₂ (Fermentas), 1 µL de albumina do soro bovino (BSA) 2 mg/mL, 0,2mM de desoxinucleosídeos trifosfato (Fermentas), 0,1 µM de cada primer (IDT) e Taq polimerase 1U (Fermentas), à qual foi adicionada 1 µL da solução de DNA molde. O protocolo de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, 28 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 seg, emparelhamento a 56 °C por 45 seg, extensão a 72 °C por 1min e 30 seg e um passo de extensão final a 72 °C por 10 min. As reacções de PCR foram realizadas num termociclador MultigeneTM Gradient Thermal Cycler (Labnet International., Inc.).

Os produtos de PCR foram observados num gel de agarose (Merck) com TAE 1,5 % (0,04M Tris-Acetato, 0,001M EDTA, pH 8.0, Fluka) com 8 µL de brometo de etídeo (VWR) para detectar a presença de produtos de amplificação.

Os produtos de amplificação foram enviados para sequenciação na empresa Stab Vida.

2.8 - Identificação dos isolados por sequenciação

O produto de amplificação do gene que codifica o 16S rRNA foi sequenciado através do primer U27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') pela empresa StabVida. As sequências obtidas foram classificadas com o programa Naive Bayesian rRNA Classifier (Version 2.0) do RDP (Ribossomal Database Project-

<http://rdp.cme.msu.edu>) e comparadas com as sequências existentes no GenBank utilizando o software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), de modo a obter uma correspondência a espécies mais próximas (Altschul et al., 1990).

2.9 - Extracção de DNA da comunidade bacteriana total da rizosfera

O DNA bacteriano total foi extraído de cada uma das subamostras de cada espécie, e amostra de sedimento controlo de cada local a partir de 0,5 gramas do *pellet* resultante da extracção de células microbianas usando o kit MoBio Ultraclean™ soil (Cambio, Cambridge, U.K.) seguindo as instruções do fabricante.

Adicionou-se 0,5g do *pellet* a um tubo com 2 mL de uma suspensão (Bead solution) de pérolas de vidro, e agitou-se para causar a lise das células microbianas. Adicionou-se uma solução de lise, e uma solução de remoção dos inibidores útil para a reacção de PCR. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 10 min (Vortex-press-to-mix 34524) e centrifugada a 10000 x g por 30 seg (Heraeus Pico 17 Centrifuge). Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo de 2 mL. Adicionou-se uma solução para precipitar os ácidos nucleicos (isopropanol), homogeneizou-se no vórtex e centrifugou-se a 10000 x g por 1min.

Adicionou-se 700 µL da solução anteriormente obtida a um microtubo com filtro e centrifugou-se a 10000 x g por 1 min. Adicionou-se ao filtro, 300µL de solução lavagem contendo etanol e centrifugou-se nas mesmas condições. Transferiu-se o filtro para um novo microtubo e adicionou-se 50 µL de solução que dissolve o DNA aprisionado no filtro, arrastando-lo para o microtubo de 2mL. De seguida conservou-se o DNA a -20°C.

2.10- Análise da diversidade do gene 16S rRNA por DGGE

A partir das amostras de DNA da comunidade total dos diferentes sedimentos de rizosfera de *Halimione portucaloides* e *Sarcocornia perennis perennis*, e sedimentos controlo dos diferentes locais foi amplificada a região V6 do rRNA 16S por *nested* PCR.

No primeiro PCR usou-se os *primers* U27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e 1494L (5'-CTA CGG (RTA) CCT TGT TAC GAC-3') (Costa et al., 2006).

Cada mistura de reacção de 25 µL continha tampão KCl 1x (Fermentas), 3,75 mM MgCl₂ (Fermentas), 1 µL de albumina do soro bovino (BSA) 2 mg/mL, 0,2mM de desoxinucleosídeos trifosfato (Fermentas), 0,1 µM de cada *primer* (IDT) e Taq polimerase 1U (Fermentas), à qual foi adicionada 1 µL da solução de DNA molde. O protocolo de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, 28 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 seg, emparelhamento a 56 °C por 45 seg, extensão a 72 °C por 1 min e 30 seg e um passo de extensão final a 72 °C por 10 min.

No segundo PCR usou-se os *primer's* F968-GC (5' – CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGC GAA CGC GAA GAA CCT TAC -3') e 1491L (5'- CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3') e um GC-clamp ligado à extremidade 5' do *primer* directo para aumentar a separação das bandas de DGGE na análise electroforética. Cada mistura de reacção de 25 µL continha tampão KCl 1x (Fermentas), 3.0mM MgCl₂ (Fermentas), 0,5 µL de acetamida (50%), 0,2 mM de desoxinucleosídeos trifosfato (Fermentas), 0,1 µM de cada *primer* (IDT) e Taq polimerase 1U (Fermentas), à qual foi adicionada 1 µL da solução de DNA molde, proveniente do produto da primeira reacção de PCR. O protocolo de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação a 94 °C por 4 min., 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, emparelhamento a 53 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min e 30 seg e um passo de extensão final a 72 °C por 7 min. As reacções de PCR foram realizadas num termociclador MultigeneTM Gradient Thermal Cycler (Labnet International., Inc.).

Os produtos de PCR foram observados num gel de agarose (Merck) com TAE 1,5 % (0,04 M tris-acetato, 0,01M EDTA, pH 8-Sigma) com 8 µL de brometo de etídeo (VWR) para detectar a presença de produtos de amplificação.

Os perfis de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) foram obtidos com um gradiente desnaturante duplo contendo 6 a 9% de acrilamida (Rotiphorese) e 32 a 60% de solução desnaturante (Gomes et al., 2005). Considerou-se como 100% desnaturante a composição correspondente a 7M de ureia (Merck), 40% de formamida desionizada (Fluka) e 0.5% de TAE 50x com acetato de sódio (0.5M Tris-Base - 0.05M EDTA; 0.1M CH₃CO₂Na, pH 8.0- Sigma).

A polimerização foi iniciada adicionando 85 µL de APS 10% (persulfato de mónia-Bio-rad) e 30 µL de (TEMED N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina - Sigma) a cada uma das soluções do gradiente.

A electroforese foi realizada num sistema DGGE 2401 (C.B.S. Scientific Company, Inc.) em tampão TAE 1x com acetato de sódio, à temperatura de 60 °C com uma voltagem constante de 220 V durante 16 horas. Após a corrida, o gel foi transferido para uma solução de fixação contendo 10% de etanol e 0.5% de ácido acético glacial (Merck). Após uma lavagem com água destilada, o gel foi imerso em solução de coloração (AgNO₃%, 0.2 Merck). Após 15 minutos de coloração adicionou-se a solução de desenvolvimento (Formaldeído 37%, NaOH 1.5%, Merck). Uma vez visíveis as bandas, interrompeu-se a reacção por adição de solução STOP (Na₂CO₃ 0.75%, Fluka) (Heuer et al., 2001). De seguida, o gel foi digitalizado no Molecular Imager FxTM system (Bio-Rad) para posterior análise estatística.

2.11- Análise da diversidade do gene *nifH* por DGGE

A partir das amostras de DNA da comunidade total dos diferentes sedimentos de rizosfera de *Halimione portucaloides* e *Sarcocornia perennis perennis*, e sedimentos controlo dos diferentes locais fomos estudar fragmentos de sequência correspondente aos genes bacterianos de *nifH*, amplificados por *nested* PCR.

No primeiro PCR usou-se os *primers* *nifH* for A (5'-GCIWTITAYGGNAARGGNGG-3') e *nifH* for rev. (5'-GCRTAIABNGCCATCATYT-3') (Burgmann et al., 2005). Cada mistura de reacção de

20 µL continha tampão KCl 1x (Fermentas), 2,0 mM MgCl₂ (Fermentas), albumina do soro bovino (BSA) 5 mg.mL⁻¹, 200 µM de desoxinucleosídeos trifosfato (Fermentas), 2 µM de cada *primer* (Thermo Scientific) e Taq polimerase 1U (Fermentas), à qual foi adicionada 1 µL da solução de DNA molde. O protocolo de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 seg, emparelhamento a 54 °C por 8 seg, extensão a 74 °C por 10 seg e um passo de extensão final a 72 °C por 10 min.

Na segunda reacção de PCR usou-se os *primers* nifH for B (5'- CGI TGY GAY CCN AAV GCN GA-3') e nif for rev. (5'- GCRTAIABNGCCATCATYT-3') e um GC-clamp ligado à extremidade 5' do primer directo para aumentar a separação das bandas de DGGE na análise electroforética. Cada mistura de reacção de 25 µL continha tampão KCl 1x (Fermentas), 2,0 mM MgCl₂ (Fermentas), BSA 0,3 mg.mL⁻¹, 200 µM de desoxinucleosídeos trifosfato (Fermentas), 1 µM de cada *primer* (Thermo Scientific) e Taq polimerase 1U (Fermentas), à qual foi adicionada 1 µL da solução de DNA molde, proveniente do produto da primeira reacção de PCR. O protocolo de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 11 seg emparelhamento a 51 °C por 8 seg, extensão a 74 °C por 10 seg e um passo de extensão final a 72 °C por 10 min. As reacções de PCR foram realizadas num termociclador MultigeneTM Gradient Thermal Cycler (Labnet International., Inc.).

Os produtos de PCR foram observados num gel de agarose (Merck) com TAE 1,5 % (0,04 M tris-acetato, 0,01 M EDTA, pH 8 - Sigma) com 8 µL de brometo de etídeo (VWR) para detectar a presença de produtos de amplificação.

Os perfis de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) foram obtidos com um gradiente desnaturante duplo contendo 10% de acrilamida (Rotiphorese) e 35 a 60% de solução desnaturante (Burgmann, 2005). Considerou-se como 100% desnaturante a composição correspondente a 7M de ureia (Merck), 40% de formamida desionizada (Fluka) e 0.5% de TAE 50x com acetato de sódio (0.5M Tris-Base, 0.05M EDTA; 0.1M CH₃CO₂Na, pH 8.0- Sigma).

A polimerização foi iniciada adicionando 85 µL de APS 10% (persulfato de mónia-Bio-rad) e 30 µL de (TEMED N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina - Sigma) a cada uma das soluções do gradiente.

A electroforese foi realizada num sistema DGGE 2401 (C.B.S. Scientific Company, Inc.) em tampão TAE 1x com acetato de sódio, à temperatura de 60 °C com uma

voltagem constante de 220 V durante 16 horas. Após a corrida, o gel foi transferido para uma solução de fixação contendo 10% de etanol e 0.5% de ácido acético glacial (Merck). Após uma lavagem com água destilada, o gel foi imerso em solução de coloração (AgNO_3 0.2%, Merck). Após 15 minutos de coloração adicionou-se a solução de desenvolvimento (Formaldeído 37%, NaOH 1.5%, Merck). Uma vez visíveis as bandas, interrompeu-se a reacção por adição de solução STOP (Na_2CO_3 0.75%, Fluka) (Heuer et al., 2001). De seguida, o gel foi digitalizado no Molecular Imager FxTM system (Bio-Rad) para posterior análise estatística.

2.12 - Análise estatística dos geis de DGGE (16S rRNA e nifH)

Para converter e normalizar a imagem do gel utilizou-se o programa de computador GelCompar 4.0 com uma resolução de 500 pontos.

A posição e quantificação das bandas em cada coluna (amostra) foram tratadas com uma tolerância e optimização de 4 pontos. A padronização das bandas foi feita automaticamente pelo programa GelCompar e cuidadosamente confirmada manualmente, fazendo-se alterações sempre que necessário. Posteriormente, o programa construiu uma matriz contendo as posições das bandas e transformou a intensidade de cada banda num valor de abundância. Dessa matriz obteve-se uma matriz de abundâncias relativas e uma matriz com o número de ribotipos de cada amostra, que posteriormente foram submetidas ao PRIMER V6 para sua análise estatística.

Com o objectivo de identificar e caracterizar grupos de afinidade entre as espécies de plantas em estudo e o controlo, as matrizes foram analisadas com o coeficiente de similaridade de Bray-Curtis, e a matriz de similaridade dos dados de abundância relativa foi examinada por análise de ordenação, pelo método de escalonamento multidimensional não paramétrico (NMDS) (Clarke e Warwick, 2001).

Posteriormente, as matrizes de similaridade dos dados da abundância relativa foram analisadas de acordo com um desenho experimental hierárquico, com o local como factor fixo principal para os géis espaciais. Para tal recorreu-se a análise de variância permutacional multivariável (Anderson, 2001) do pacote adicional PERMANOVA+ do PRIMER v6 (Anderson *et al.*, 2008). Com este desenho foi testada a hipótese nula de

que não existem diferenças significativas entre as amostras. Os termos significativos foram investigados a *posteriori* usando comparações entre espécies de planta num mesmo local recorrendo à estatística-t da PERMANOVA e permutações sujeitas a um modelo reduzido (Anderson *et al.*, 2008).

Os valores de t dos testes principais consideram que os grupos são significativamente diferentes de $t \leq 0,05$.

3-RESULTADOS

3.1 - Caracterização físico-química dos sedimentos

As características físico-químicas do sedimento colonizado por *Halimione portucaloides*, *Sarcocornia perennis perennis* e sedimento controlo em cada local de amostragem, são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 Propriedades físico-químicas dos sedimentos colonizados com *Halimione portucaloides*, *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* e não colonizados (controlo) na Barra, Costa Nova e Vagueira

	<i>Amostra</i>	<i>Conteúdo em água (%)</i>	<i>Salinidade (PSU)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Potencial redox (mV)</i>	<i>Matéria Orgânica (%)</i>	<i>Nitrato + Nitrito (μmol gdw⁻¹)</i>
Local Barra	<i>H. portucaloides</i> *	72,6	28,4	16,6	-145	17,4	3,42
	<i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i> *	77,7	28,1	17,0	-126	17,0	4,42
	Controlo	77,3	29,3	16,7	-97	17,7	4,26
Local Costa Nova	<i>H. portucaloides</i>	74,2	24,3	16,9	-123	16,6	3,82
	<i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i>	75,4	25,9	17,1	-87	16,2	4,05
	Controlo	73,4	25,9	16,9	-59	17,4	3,75
Local Vagueira	<i>H. portucaloides</i>	73,8	15,8	16,3	-103	15,9	1,30
	<i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i>	59,7	— [#]	16,1	-78	15,4	— [#]
	Controlo	73,3	16,8	15,4	-38	16,1	0,96

* Os valores apresentados são os valores médios das quatro subamostras

[#] As análises não foram realizadas porque não foi possível recolher uma quantidade suficiente de água intersticial

Os sedimentos colonizados por *Halimione portucaloides* apresentaram valores idênticos no conteúdo em água na Barra, Costa Nova e Vagueira (72,6%, 74,2%, 73,3%, respectivamente).

Os sedimentos colonizados por *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* apresentaram valores idênticos no conteúdo em água na Barra e Costa Nova (77,7% e 75,4 %, respectivamente) e um valor inferior na Vagueira (59,7%).

Os sedimentos controlo apresentaram valores no conteúdo em água ligeiramente próximos para os diferentes locais (Barra - 77,3%, Costa Nova - 73,4%, Vagueira - 73,3%).

A salinidade variou entre 15,8 – 25,9 PSU nos três locais, registando-se os valores mais elevados na Barra (28,1 - 29,3 PSU) e os mais baixos na Vagueira (15 – 17 PSU). Em cada local., a diferença máxima de salinidade entre os diferentes sedimentos num mesmo local ocorreu na Costa Nova. Não se observou um padrão definido em relação ao tipo de colonização.

Na data de colheita, as temperaturas registadas variaram entre 15,4 e 17,1 °C, similares entre os vários tipos de sedimentos e entre locais de amostragem.

O potencial redox registou um aumento progressivo com o afastamento da embocadura sendo o valor mais baixo registado na Barra (*Halimione portucaloides* -145 mV) e o mais elevado na Vagueira (Controlo -38 mV). Em cada local., o potencial redox foi mais baixo em sedimentos colonizados por *Halimione portucaloides* (Barra - 145mV, Costa Nova -123mV e Vagueira -103mV), do que nos sedimentos colonizados por *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* (Barra -126mV, Costa Nova -87mV, Vagueira -78 mV). Os sedimentos colonizados registaram um potencial redox mais baixo do que os não colonizados.

O teor de matéria orgânica nos sedimentos variou ligeiramente entre os diferentes locais de amostragem. Os teores mais elevados foram registados na Barra e os mais baixos na Vagueira. Entre os diversos tipos de colonização, verificaram-se os valores mais baixos *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* e os mais elevados no controlo.

A concentração de nutrientes (nitrato + nitrito) na Barra (3,42 – 4,42µmol.gdw⁻¹) e Costa Nova (3,75 – 4,05 µmol.gdw⁻¹) foi bastante mais elevada do que na Vagueira (0,96 – 1,30µmol.gdw⁻¹), onde se registaram os valores mínimos para este parâmetro. Em cada local, a concentração de nitrato + nitrito nos sedimentos colonizados foi idêntica à registada nos sedimentos controlo.

O resultado da análise granulométrica dos sedimentos é apresentado na tabela 2. Os três locais de amostragem apresentaram sedimentos com características distintas. Na Barra foram encontrados os sedimentos de granulometria mais fina, variando entre vasa e areia fina muito siltosa. Os sedimentos da Costa Nova foram classificados como areia média muito siltosa ou areia média siltosa e na Vagueira todos os sedimentos foram classificados como areia média siltosa. A percentagem de finos (52,3-7,1%) diminuiu no sentido do afastamento da embocadura para cada espécie de planta e sedimentos controlo, o mesmo se verificando com os valores de ϕ mediano. Não foi detectado um padrão de variação dos descritores granulométricos entre sedimentos colonizados e não colonizados de cada local.

Tabela 2. Caracterização granulométrica dos sedimentos colonizados com *Halimione portucalooides*, *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* e não colonizado (controlo) na Barra, Costa Nova e Vagueira.

	Amostra	Granulometria		
		Finos (%)	Mediana (ϕ)	Classificação do sedimento
Local Barra	<i>H. portucalooides</i>	52,33	4,14	Vasa
	<i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i>	55,46	4,1	Vasa
	Controlo	37,56	3,32	Areia fina muito siltosa
Local Costa Nova	<i>H. portucalooides</i>	24,94	1,69	Areia média muito siltosa
	<i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i>	18,89	1,64	Areia média siltosa
	Controlo	31,15	1,81	Areia média muito siltosa
Local Vagueira	<i>H. portucalooides</i>	7,1	1,27	Areia média siltosa
	<i>S. perennis</i> subsp. <i>perennis</i>	11,14	1,25	Areia média siltosa
	Controlo	24,23	1,89	Areia média siltosa

3.2 - Concentração de nitrato nos tecidos das plantas

Os resultados da análise da concentração de nitrato em diferentes partes da planta (raiz, caule e folhas/artículos) encontram-se representados na figura 8.

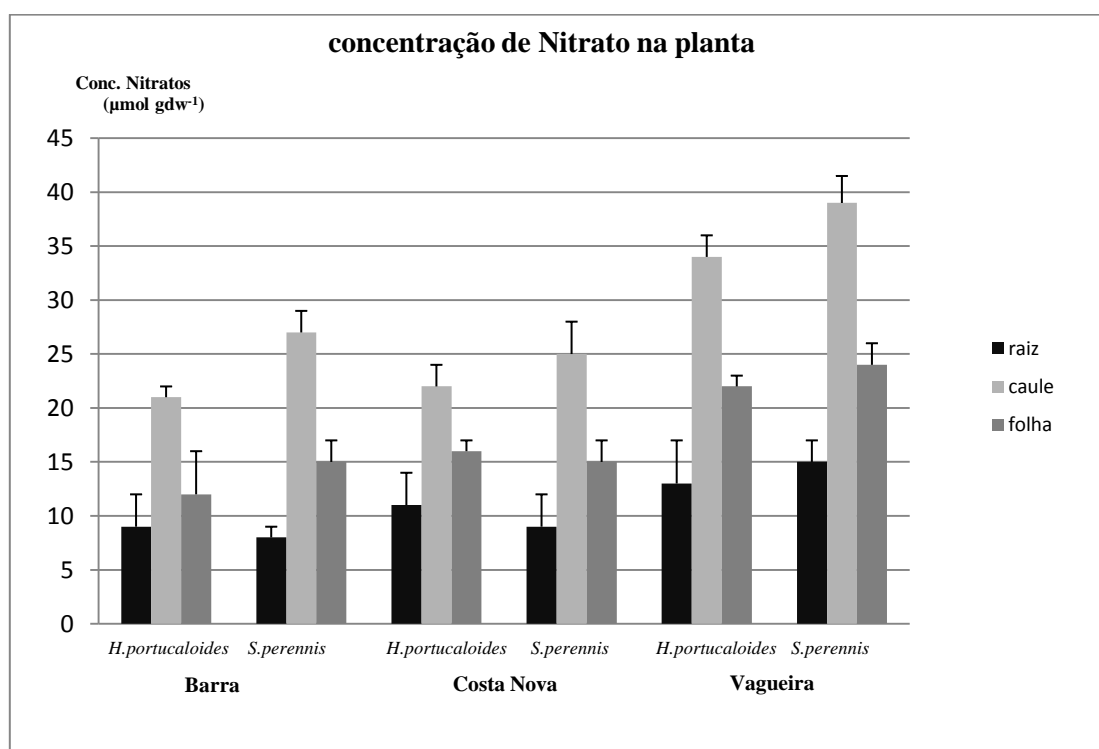


Figura 8. Concentração de nitrato (raiz, caule e folhas/artículos) de *Halimione portucaloides* e *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* em três locais de amostragem (Barra, Costa Nova e Vagueira) (média \pm erro padrão; n=4)

Verificou-se uma tendência de acumulação dos nitratos nos caules de *Halimione portucaloides* e *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* nos diferentes locais. *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* de um modo geral acumula mais nitratos do que *Halimione portucaloides*. Na Vagueira verificou-se maior acumulação de nitratos nas plantas.

Comparando a mesma espécie em diferentes locais: verificou-se uma menor concentração de nitratos nas raízes de *Halimione portucaloides* na Barra ($9 \mu\text{mol gdw}^{-1}$) e uma maior concentração de nitratos nos caules ($34 \mu\text{mol gdw}^{-1}$) e folhas ($22 \mu\text{mol gdw}^{-1}$)

gdw⁻¹) na Vagueira. Quanto a *Sarcocornia*, verificou-se uma maior concentração de nitratos na raiz (15 µmol gdw⁻¹), caule (39 µmol gdw⁻¹) e folhas/artículos (24 µmol gdw⁻¹) na Vagueira.

3.3 – Teor de bactérias diazotróficas cultiváveis

Os resultados das contagens de colónias em meio de Burk, como estimativa da abundância de bactérias diazotróficas nos diferentes tipos de sedimento encontram-se representados na figura 9.

Os teores de bactérias diazotróficas cultiváveis variaram entre $9,7 \times 10^2$ e $3,7 \times 10^3$ UFC/g dw⁻¹. Os sedimentos não colonizados registaram menor abundância de bactérias diazotróficas do que os sedimentos colonizados por *Halimione portulacoides* e *Sarcocornia perennis perennis* nos três locais de amostragem.

Os sedimentos colonizados com *H. portulacoides* apresentaram sempre as contagens mais elevadas de bactérias diazotróficas (Barra $3,7 \times 10^3$ UFC/g dw⁻¹, Costa Nova $3,1 \times 10^3$ UFC/g dw⁻¹, Vagueira $3,1 \times 10^3$ UFC/g dw⁻¹).

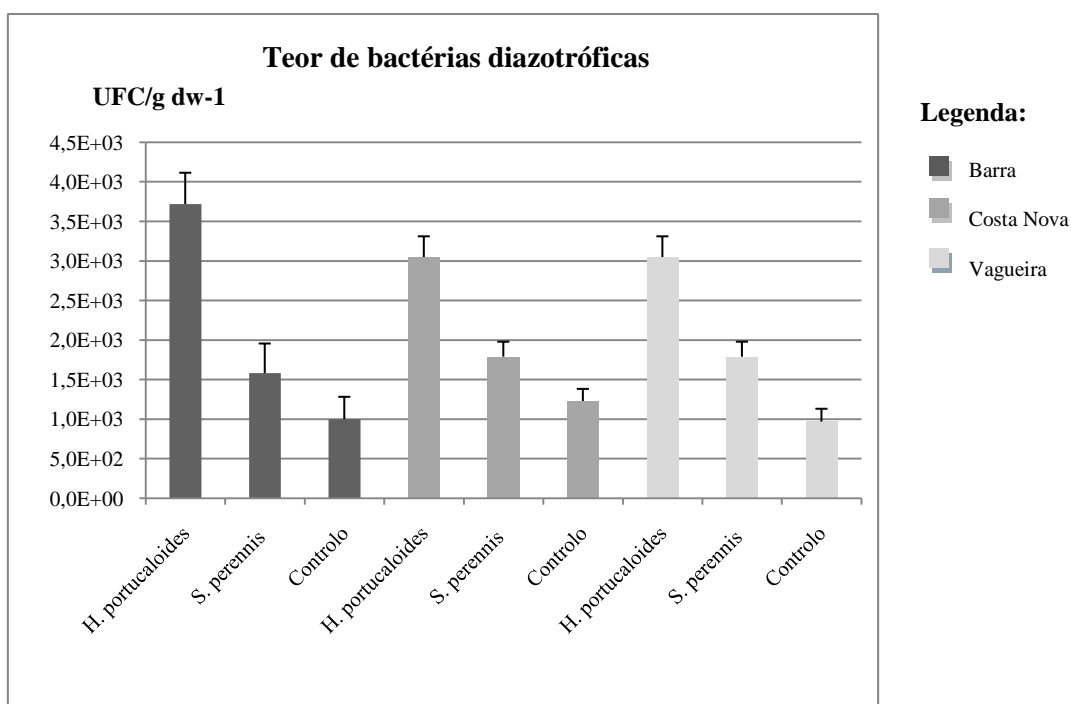


Figura 9. Abundância de bactérias diazotróficas nos sedimentos colonizados por *Halimione portulacoides*, *Sarcocornia perennis* e nos sedimentos controlos na Barra, Costa Nova e Vagueira.

3.4 – Isolamento e identificação de bactérias diazotróficas

A partir das colónias que se desenvolveram nas placas de meio de Burk utilizado para a estimativa da abundância de bactérias diazotróficas obtiveram-se 30 isolados que foram sujeitos a tipagem molecular por Box-PCR.

Na figura 10 é apresentado um gel de electroforese representativo do tipo de padrões de bandas obtidos. A análise visual dos padrões de Box-PCR permitiu inferir sobre a existência de diferentes clones, subsequentemente confirmada por análise do gel recorrendo ao software Diversity Database (Bio-rad Laboratories).

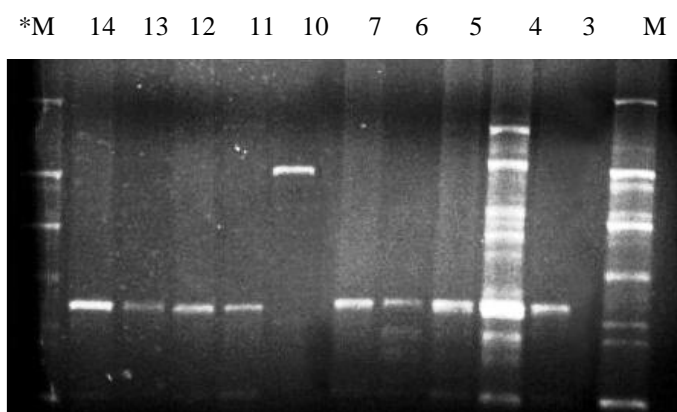


Figura 10. Tipagem molecular por Box-PCR dos isolados bacterianos obtidos. *M - Marcador; 10 – Barra, banco de *H. portucaloides*; 11 – Barra, banco de *S. perennis perennis*; 12 e 13 – Costa Nova, banco de *H. portucaloides*; 3 e 14 - Vagueira, controle; 4, 6, 7 e 12 - Vagueira, banco de *H. portucaloides*; 5 - Vagueira, banco de *S. perennis perennis*;

O dendograma representando as relações de semelhança entre os perfis de Box-PCR dos isolados obtidos em diferentes tipos de sedimento dos 3 locais de amostragem é apresentado na figura 11.

Os isolados cujos perfis apresentaram um grau de similaridade superior a 65% foram considerados como a mesma espécie, permitindo a selecção de um representante de cada clone.

A composição dos grupos é apresentada na tabela 3, com indicação do isolado seleccionado para estudo do gene *nif H*.

Todos os isolados seleccionados tiveram amplificação para o gene *nifH*, sendo sujeitos a sequenciação do gene 16S rRNA, para posterior identificação.

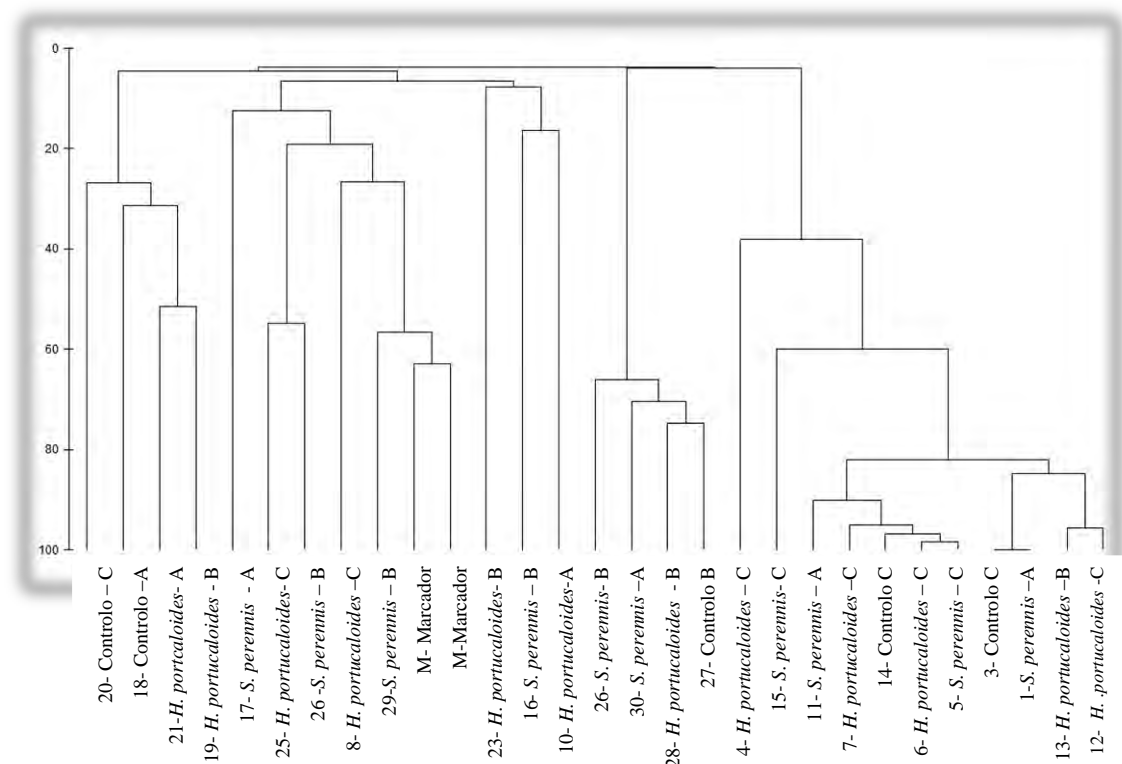


Figura 11. Grau de similaridade dos isolados obtidos a partir dos sedimentos de *Halimione portucalooides*, *Sarcocornia perennis perennis* e sedimentos controlos dos locais Barra, Costa Nova e Vagueira

Tabela 3. Grupos de isolados, após análise dos perfis de similaridade (Box-PCR)

Grupos de isolados	
1,3*,5,6,7,11,12,13,14,15	Isolados da mesma espécie (clones)
26*,27,28,30	Isolados da mesma espécie (clones)
2*,4*,8*,9*,10*,16*,17*,18*,19*, 20*,21*,22*,23*,24*,25*,29*	Isolados de espécies diferentes

*Isolados seleccionados para estudo do gene *nif H* e posterior sequenciação do gene 16S rRNA para identificação

As sequências obtidas para cada isolado foram sujeitas a análise pelo programa RDP (Ribossomal database Project) e comparadas com as sequências existentes no GenBank permitindo obter as identificações apresentadas na tabela 4.

As espécies bacterianas identificadas nos sedimentos de sapal nos locais em estudo foram *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus sp.*, *Bacillus megaterium* e *Gammaproteobacterium CEE131_32* verificando-se uma predominância do género *Pseudomonas*.

Tabela 4. Resultados da análise da sequência de fragmentos do gene 16S rRNA dos isolados

Código do clone	Relação filogenética				
	Classificação RDP ^a Classe/Ordem/Família	%	Identificação BLAST	%	Nº de acesso ^b
2	Bacilli	100	<i>Bacillus sp.</i>	98	FJ169465
	Bacillales	100			
	Phanococcaceae	100			
3	Gammaproteobacteria	100	<i>Pseudomonas sp.</i>	98	GQ988399
	Pseudomonadales	100			
	Pseudomonadaceae	100			
4	Gammaproteobacteria	100	<i>Pseudomonas sp.</i>	94	FJ805431
	Pseudomonadales	100			
	Pseudomonadaceae	100			
8	Gammaproteobacteria Não classificada		<i>Gammaproteobacterium CEE131_32</i>	95	FM955226
9	Bacilli	100	<i>Bacillus megaterium</i>	98	EU194337
	Bacillales	100			
	Bacillaceae	100			
10	Bacilli	100	<i>Bacillus megaterium</i>	96	EU834239
	Bacillales	100			
	Bacillaceae	100			
16	Actinobacteria	100	<i>Rhodococcus sp.</i>	99	GQ495640
	Actinomycetales	100			
	Nocardiaceae	100			
17	Gammaproteobacteria	100	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	GU166131
	Pseudomonadales	100			
	Pseudomonadaceae	100			
18	Proteobacteria Não classificada		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	85	AY622219
19	Gammaproteobacteria	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	96	EU862080
	Pseudomonadales	100			
	Pseudomonadaceae	100			
20	Bacilli	100	<i>Bacillus megaterium</i>	99	EU194337
	Bacillales	100			
	Bacillaceae	100			
21	Bacilli	100	<i>Bacillus megaterium</i>	98	GU124692
	Bacillales	100			
	Bacillaceae	100			
22	Gammaproteobacteria	100	<i>Pseudomonas sp.</i>	94	AY166943
	Pseudomonadales	100			
	Pseudomonadaceae	100			
23	Não classificada		<i>Bacillus sp.</i>	89	EU070408.1
26	Gammaproteobacteria	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	97	EU862080
	Pseudomonadales	100			
	Pseudomonadaceae	100			

^a - Classificação RDP – Ribossomal Database Project^b – número de acesso GeneBank de sequência mais parecida

*Os isolados 24, 25 e 29 não foram identificados por sequenciação

3.5 – Diversidade das comunidades bacterianas (gene 16S rRNA)

Os perfis de DGGE dos genes 16S rRNA da comunidade bacteriana total de cada sedimento são apresentados na figura 12. Os padrões de bandas dos diferentes perfis revelam diferenças entre a estrutura das comunidades das rizosferas das duas plantas e também entre as rizosferas de diferentes plantas da mesma espécie (entre subamostras).

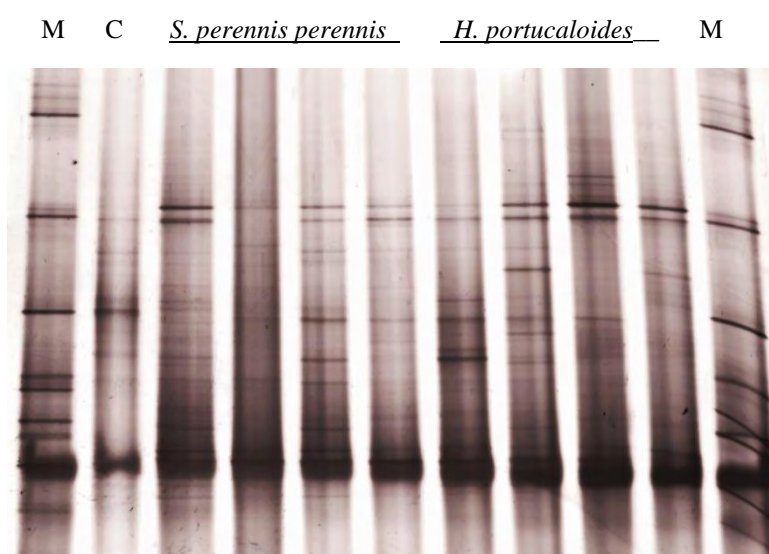


Figura12. Perfis de DGGE de fragmentos do gene 16S rRNA, amplificado a partir do sedimento da rizosfera de *H. portucaloides*, *S. perennis perennis* e de sedimento controlo (C). M - Marcador

Os perfis de DGGE de fragmentos do gene 16s rRNA foram sujeitos a análise da variância permutacional multivariável pelo pacote PERMANOVA do PRIMER v6. Pelo método de escalonamento multidimensional não paramétrico (NMDS) obtiveram-se os resultados representados nas Figuras 13, 14 e 15.

Com base no teste PERMANOVA verifica-se que quando o valor de t não é inferior ou igual a 0,05 (Tabela 5) não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados obtidos não revelam diferenças significativas entre as comunidades da rizosfera de *Halimione portucaloides*, *Sarcocornia perennis* num mesmo local, nem entre as comunidades de rizosferas de subamostras.

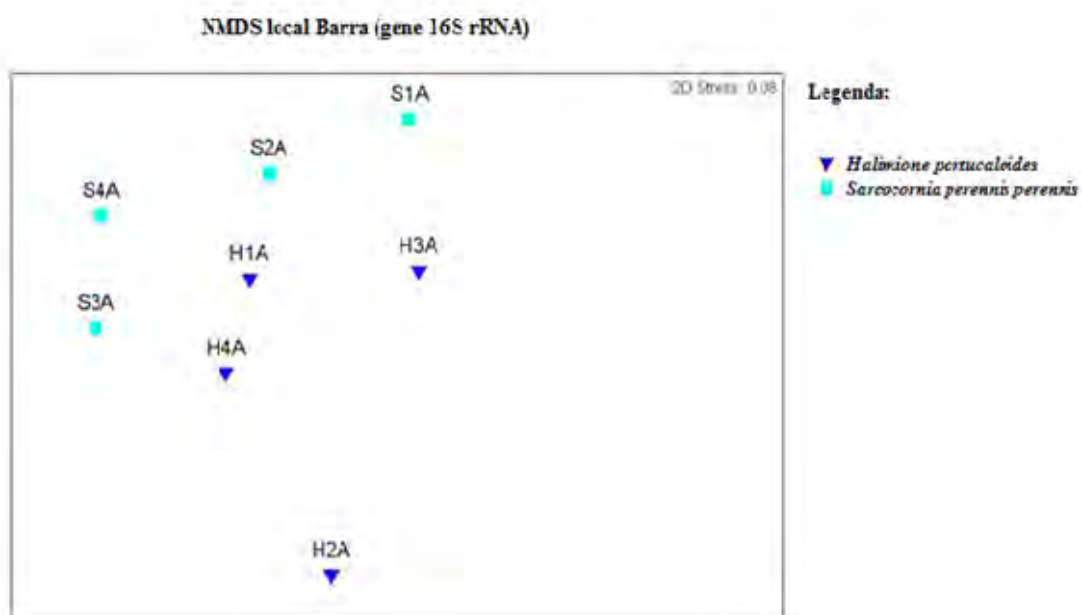


Figura 13. Análise de DGGE para fragmentos do gene 16S rRNA, amplificado a partir do sedimento da rizosfera de *H. portucalooides* (n=4), *S. perennis* subsp. *perennis* (n=4) da Barra, por NMDS (Método de escalonamento multidimensional não paramétrico).

S – *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*, *H* – *Halimione portucaloide*; 1,2,3 e 4 corresponde ao número da subamostra; A – Barra

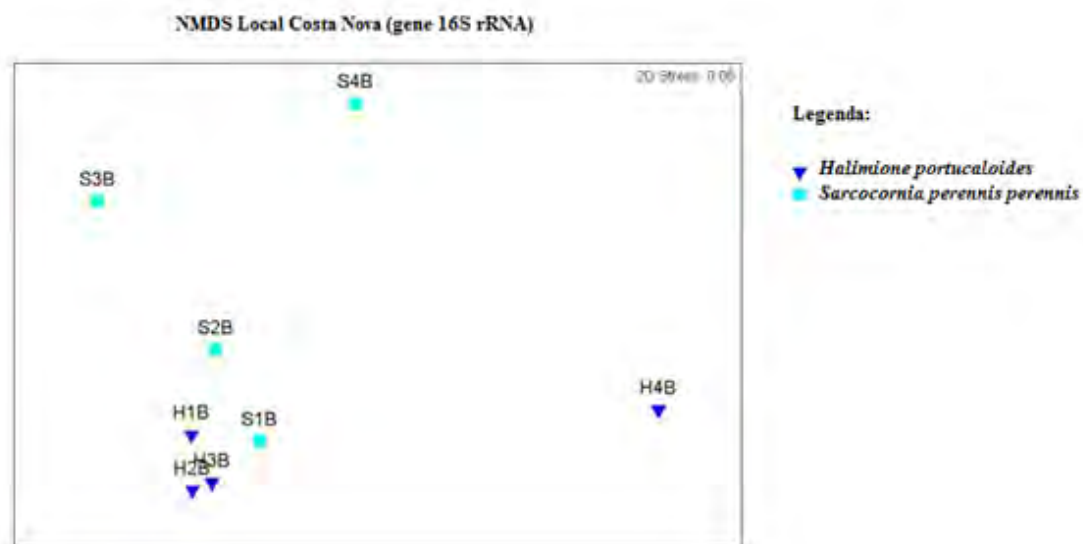


Figura 54. Análise de DGGE para fragmentos do gene 16S rRNA, amplificado a partir do sedimento da rizosfera de *H. portucalooides* (n=4), *S. perennis* subsp. *perennis* (n=4) da Costa Nova, por NMDS (Método de escalonamento multidimensional não paramétrico).

S – *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*, *H* – *Halimione portucaloide*; 1,2,3 e 4 corresponde ao número da subamostra; B - Costa Nova

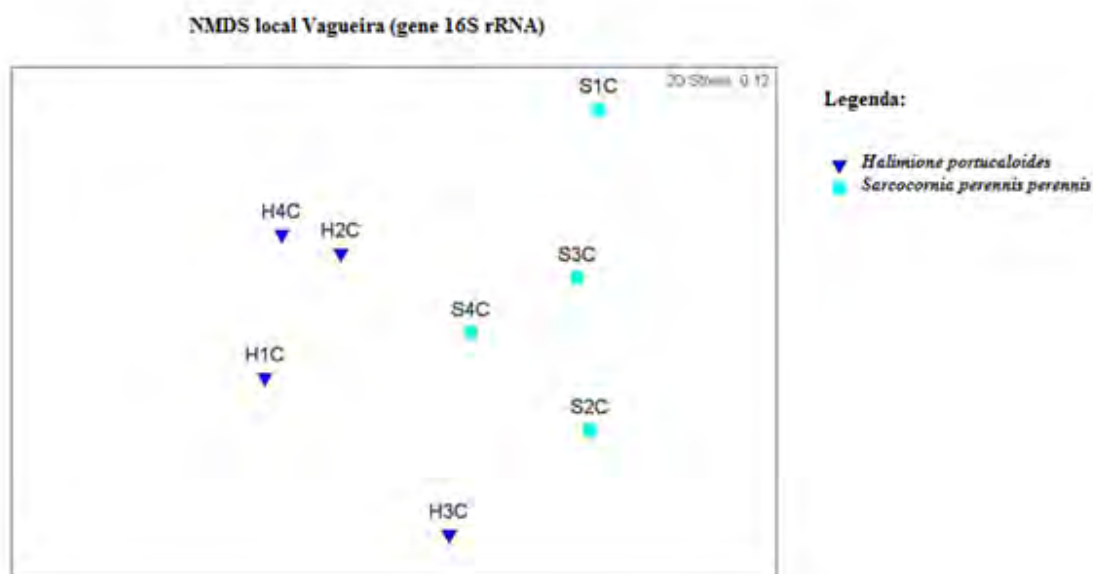


Figura 65. Análise de DGGE para fragmentos do gene 16S rRNA, amplificado a partir do sedimento da rizosfera de *H. portucalooides* (n=4), *S. perennis subsp. perennis* (n=4) da Vagueira, por NMDS (Método de escalonamento multidimensional não paramétrico).

S – *Sarcocornia perennis subsp. perennis*, *H* – *Halimione portucalooides*; 1,2,3 e 4 corresponde ao número da subamostra; C - Vagueira

Tabela 5. Análise da variância multivariável pelo pacote PERMANOVA do PRIMERv6 dos perfis de DGGE dos fragmentos dos genes 16S rRNA.

		Nível de significância $t^* \leq 0,05$
Local Barra	<i>Halimione portucalooides</i> – <i>Sarcocornia perennis perennis</i>	0,29
Local Costa Nova	<i>Halimione portucalooides</i> – <i>Sarcocornia perennis perennis</i>	0,37
Local Vagueira	<i>Halimione portucalooides</i> – <i>Sarcocornia perennis perennis</i>	0,14

* $t \leq 0,05$ – significa que é estatisticamente significativo

3.6 – Diversidade das comunidades bacterianas diazotróficas (gene nifH)

Os perfis de DGGE de fragmentos do gene nifH da comunidade bacteriana dos sedimentos foram estudados pelo método de escalonamento multidimensional não paramétrico (NMDS) obtendo-se os resultados representados nas Figuras 16, 17 e 18 e sujeitos a análise da variância permutacional multivariável pelo pacote PERMANOVA do PRIMER v6.

De acordo com o teste PERMANOVA verifica-se que quando t é inferior ou igual a 0,05 (Tabela 6), há diferenças estatisticamente significativas no gene nifH (nitrogenase) das comunidades bacterianas presentes no sedimento.

Na Barra há diferenças significativas no gene nifH das comunidades bacterianas da rizosfera de *Halimione portucaloides* e *Sarcocornia perennis* ($t = 0,05$). A diversidade do gene nifH nas comunidades bacterianas da rizosfera de *Halimione portucaloides* e *Sarcocornia perennis* é similar.

Na Costa Nova e Vagueira o valor de t é sempre maior que 0,05 por isso, há diferenças estatisticamente significativas. Esta análise revela que há diversidade do gene nifH nas comunidades bacterianas dos sedimentos colonizados e não colonizados, em sedimentos colonizados com espécies diferentes e entre sub-amostras de sedimentos colonizados com a mesma espécie. A Barra apresenta valor de t de 0,05, como tal é neste local que o gene nifH presente nas bactérias do sedimento é menos heterogéneo e os sedimentos da Costa Nova e da Vagueira possuem comunidades bacterianas com maior heterogeneidade do gene nifH.

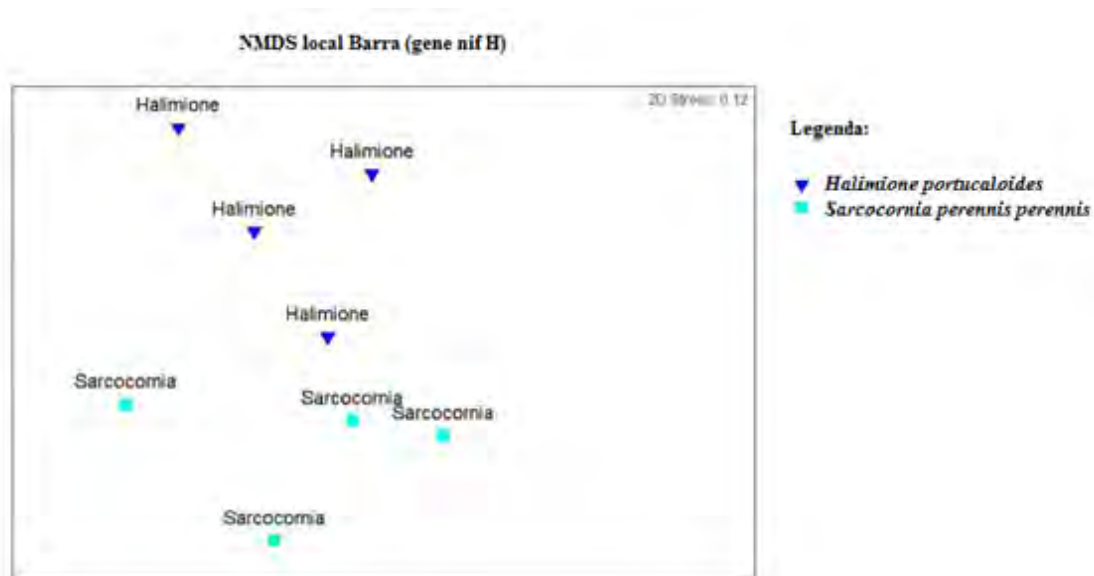


Figura 76. Análise de DGGE para fragmentos do gene *nifH*, amplificado a partir do sedimento da rizosfera de *H. portucaloides* (n=4), *S. perennis* subsp. *perennis* (n=4) da Barra, por NMDS (Método de escalonamento multidimensional não paramétrico).

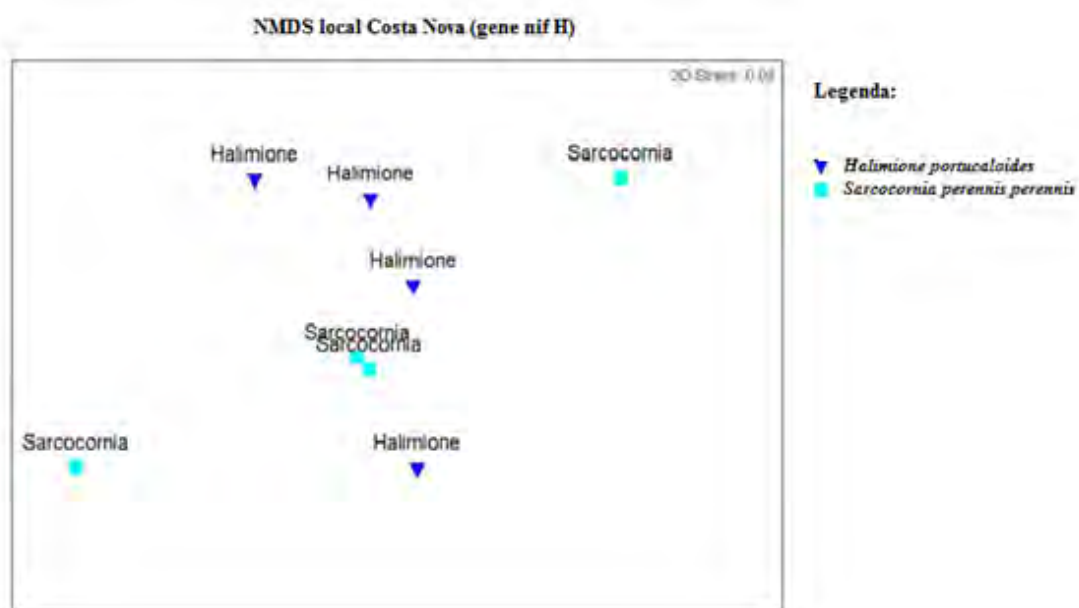


Figura 17. Análise de DGGE para fragmentos do gene *nifH*, amplificado a partir do sedimento da rizosfera de *H. portucaloides* (n=4), *S. perennis* subsp. *perennis* (n=4) da Costa Nova, por NMDS (Método de escalonamento multidimensional não paramétrico).

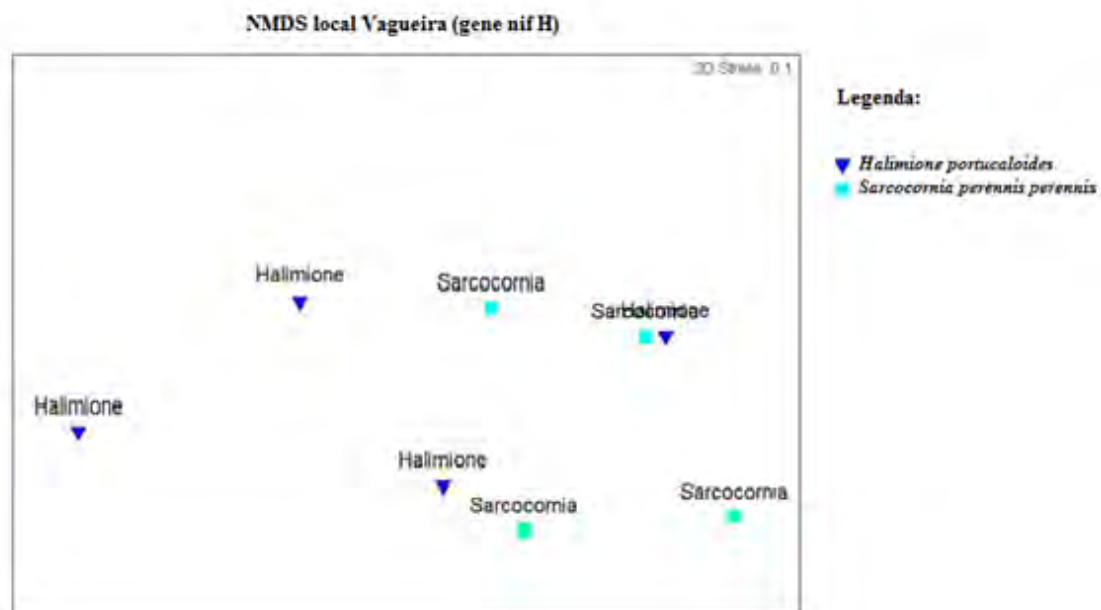


Figura 18. Análise de DGGE para fragmentos do gene *nifH*, amplificado a partir do sedimento da rizosfera de *H. portucaloides* (n=4), *S. perennis* subsp. *perennis* (n=4) da Vagueira, por NMDS (Método de escalonamento multidimensional não paramétrico).

Tabela 6. Análise da variância multivariável pelo pacote PERMANOVA do PRIMERv6 dos perfis de DGGE dos fragmentos do gene *nifH*.

		Nível de significância $t^* \leq 0,05$
Local Barra	<i>Halimione portucaloides</i> – <i>Sarcocornia perennis perennis</i>	0,05
Local Costa Nova	<i>Halimione portucaloides</i> – <i>Sarcocornia perennis perennis</i>	0,35
Local Vagueira	<i>Halimione portucaloides</i> – <i>Sarcocornia perennis perennis</i>	0,29

* $t \leq 0,05$ – significa que é estatisticamente significativo

4- DISCUSSÃO

4.1 – Influência das interacções planta-microrganismo nas características físico-químicas do sedimento

No presente estudo verificou-se que as características físico-químicas do sedimento e a abundância de bactérias diazotróficas foram diferentes em locais colonizados por diferentes plantas. Os sedimentos colonizados apresentaram uma maior abundância bacteriana do que sedimentos não colonizados, tal facto poderá ser explicado pela influência da exsudação da raiz. Os exsudados da raiz fornecem nutrientes aos microrganismos influenciando o seu crescimento e diversidade. Estes microrganismos, por sua vez alteram a presença de substratos no solo (Gomes et al., 2001).

Sedimentos colonizados por *Halimione portucaloides* e *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* diferiram em termos de abundância de microrganismos. Nos exsudados são também libertados não só nutrientes mas também metabolitos antimicrobianos específicos que exercem efeito selectivo sobre as populações microbianas (Berg e Smalla, 2009). A quantidade e a composição dos exsudados que chegam ao solo são variáveis dependendo da espécie da planta, da sua idade, fase do ciclo de vida, seu estado nutricional e condições ambientais (Hines et al., 1999).

As comunidades bacterianas da rizosfera de sedimentos de sapal estão envolvidas em processos de reciclagem de nutrientes, incluindo a decomposição da matéria orgânica (Smith et al., 1993). As bactérias são um dos componentes biológicos mais importantes no *turnover* (transformação e mineralização) da matéria orgânica no solo (Cho e Azam, 1990). A produtividade bacteriana depende da decomposição da vegetação morta e da decomposição dos exsudados da raiz (Créach et al., 1999). Os sedimentos colonizados por *Halimione portucaloides* nos diferentes locais de estudo revelaram-se mais ricos em matéria orgânica do que sedimentos colonizados por *Sarcocornia perennis*, o que pode ser explicado pela própria estrutura da planta e/ou pela presença de comunidades bacterianas na rizosfera. A diferença da abundância de bactérias entre os diferentes locais pode dever-se também às pressões selectivas exercidas por outros factores ambientais como a disponibilidade de matéria orgânica, a salinidade, a disponibilidade de oxigénio e as propriedades granulométricas do sedimento.

O potencial redox dos diferentes sedimentos estudados apresentaram valores negativos mas diferentes entre si. Os sedimentos colonizados por *Halimione portucaloides* apresentavam valores de potencial redox mais baixos do que os dos bancos de *Sarcocornia perennis*. *Halimione portucaloides* rodeia os canais do sapal sofrendo mais frequentemente períodos de inundação e apresenta uma maior abundância bacteriana na sua rizosfera. Os sedimentos não colonizados apresentavam valores de potencial menos negativos porque a abundância de microrganismos era menor, logo houve menos consumo de oxigénio, menos degradação de matéria orgânica e aumento do potencial redox. As comunidades bacterianas heterotróficas consomem oxigénio e diminuem a sua disponibilidade, para actuar como receptor de electrões. A degradação da matéria orgânica é um processo controlado pela disponibilidade de receptores e dadores de electrões, pelo que o potencial redox do sedimento é determinante na distribuição das bactérias quimiorganotróficas (Burke et al., 2002). Os sedimentos de sapal, como estão sujeitos ao encharcamento têm baixa disponibilidade de oxigénio e a degradação da matéria orgânica ocorre em condições de anaerobiose, dominando sulfatos, nitratos e ferro como receptores de electrões (Howes et al., 1985).

O potencial redox sofre variações com a salinidade e temperatura. Como a temperatura foi semelhante nos diferentes locais e nos diferentes tipos de sedimentos de cada local, o potencial redox não deverá ser significativamente alterado. A salinidade, por sua vez, foi diferente entre locais e pode ter influenciado a solubilidade do oxigénio, e contribuindo também para as variações de Eh entre locais. A Barra, sendo o local mais próximo da embocadura, apresentou valores de salinidade mais elevados e potencial redox mais negativo.

Os sedimentos colonizados apresentaram uma granulometria distinta e com maior percentagem em finos, do que sedimentos não colonizados podendo este efeito resultar da influência da vegetação do sapal nos processos de deposição e erosão do solo (Torsvik et al., 2002). A percentagem em finos diminuiu no sentido de afastamento da embocadura. A Barra apresentou maior percentagem em finos, o que pode contribuir também para a maior abundância bacteriana nos sedimentos desse local uma vez que a granulometria do sedimento é um factor relevante na distribuição das células bacterianas no solo (Créach et al., 1999). Os sedimentos vasosos da Barra revelaram-se mais propícios ao desenvolvimento bacteriano, comprovado pela maior abundância de bactérias diazotróficas. Por sua vez, a presença destes microrganismos pode influenciar

a percentagem em finos do sedimento, através das capacidades degradativas destas comunidades (LaRoque et al., 2004).

Desta forma, o presente estudo é consistente com o modelo de interacção mútua entre microrganismos e propriedades físico-químicas dos sedimentos (Semenov et al., 1999).

4.2 – Influência das características físico-químicas do sedimento na concentração de nitratos na planta

Os iões amónio e nitrato são as principais fontes de azoto nas plantas (Salsac et al., 1987).

Nos locais com maior salinidade, as plantas apresentaram menor concentração de nitrato, resultante provavelmente de uma maior competição dos iões cloro com os iões nitrato no solo. Um aumento na absorção e acumulação do ião cloreto é acompanhado por uma diminuição na concentração de iões nitrato. O ião cloreto quando presente no solo é rapidamente absorvido pelas plantas apresentando uma grande mobilidade. O sódio pode causar défices na absorção de cálcio e potássio e o cloro na absorção de nitratos (Grattan e Grieve, 1994).

A concentração de nitratos mais elevada nos caules e folhas, comparativamente às raízes, pode ser explicada pela absorção do ião nitrato de modo activo na raiz, que rapidamente é transportado para ao caule e folhas para ser acumulado em grandes quantidades nos vacúolos (Salsac et al., 1987).

O nitrato pode ser acumulado em quantidades apreciáveis nos vacúolos sem provocar efeitos nocivos. A formação de aminoácidos, amidas e outros compostos relacionados é a principal estratégia das plantas no processo de desintoxicação (Marschner, 1995).

A salinidade e encharcamento são factores chave na distribuição da vegetação de um sapal (Flowers e Colmer, 2008).

A Vagueira apresenta menor salinidade, o que contribui para uma melhor absorção de nutrientes, por isso, *Halimione portucaloides* e *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* apresentaram maiores concentrações de nitratos.

Locais com sedimentos mais redutores, como Barra e Costa Nova, apresentam plantas com menores concentrações de nitratos. O encharcamento causa privação de oxigénio, diminui o potencial redox do solo, causa défices energéticos que vão comprometer o transporte de nutrientes para a planta (Colmer e Flowers, 2008).

Neste trabalho *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* apresentava concentrações de nitratos superiores às de *Halimione portucaloides* nos diferentes locais. *Halimione portucaloides* tem uma boa capacidade adaptativa em ambientes salinos, porque transporta rapidamente para as folhas iões Na^+ e Cl^- . Estes iões são acumulados nos vacúolos dos tricomas vesiculares, que seguidamente são excretados, pelo colapso da célula vesicular (Freitas et al., 1993).

O metabolismo da fixação do CO_2 da vegetação halófita também permite explicar a capacidade da planta em concentrar nitratos para produção da sua biomassa. A assimilação dos iões nitrato é um processo activo e como tal tem gastos energéticos.

As plantas com metabolismo fotossintético mais eficiente poderão gastar mais nitratos, o que pode conduzir ao armazenamento de maior quantidade de nitratos nos vacúolos.

Como *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* apresenta uma maior concentração de nitratos, subentende-se que o metabolismo CAM é mais eficiente do que o metabolismo C_3 de *Halimione portucaloides*.

4.3 – Abundância, diversidade de bactérias diazotróficas e diversidade de genes funcionais

Um dos principais objectivos deste trabalho foi testar a hipótese de que plantas do sapal são capazes de influenciar a diversidade e actividade das comunidades bacterianas da rizosfera. Uma das actividades em estudo era avaliar a capacidade de fixação de azoto das bactérias diazotróficas.

No presente trabalho verificou-se uma maior abundância de microrganismos em sedimentos colonizados. Sedimentos pobres em nutrientes, como os do sapal apresentam plantas com sistemas radiculares bem desenvolvidos formando rizomas, de

modo a criar uma superfície dinâmica, bioquimicamente capaz de suportar diferentes gradientes químicos para o desenvolvimento de microflora.

Fazendo uma avaliação da diversidade através do estudo do gene 16S rRNA verificou-se na análise estatística que não há diferenças significativas.

As comunidades bacterianas presentes em sedimentos num mesmo local apresentam heterogeneidade espacial.

Num mesmo local, comunidades bacterianas existentes na rizosfera de duas espécies de plantas distintas revelaram-se diferentes. O mesmo se observou para comunidades bacterianas da rizosfera de diferentes sub-amostras da mesma espécie de planta.

Verificando que os sedimentos estudados diferiram nas suas características físico-químicas designadamente matéria orgânica, potencial redox, granulometria, é normal que as comunidades bacterianas sejam diferentes, pois sofrem pressões selectivas diferentes. Além disso, variação na composição química dos exsudados entre espécies de plantas pode ter criado estímulos diferenciados para as diferentes populações e afectar a diversidade da comunidade total.

4.3.1 – Diversidade de genes funcionais (gene nifH)

Os sedimentos do sapal apresentam défices de azoto e os exsudados da raiz por sua vez emitem sinais químicos que atraem bactérias fixadoras de azoto, de modo a tornarem este nutriente disponível para a planta. Estas bactérias, além de fornecerem o azoto necessário ao crescimento da planta, vão produzir fito-hormonas e competir com microrganismos patogénicos estimulando o desenvolvimento da planta (Burgmann et al., 2005). O gene funcional nifH (gene da nitrogenase reductase) tem sido um marcador genético valioso na detecção e identificação de bactérias diazotróficas (Glazer e Kechris, 2009). Deste modo, no presente estudo empregaram-se técnicas de análise da diversidade do gene nifH para caracterizar a diazotrofia dos sedimentos. As bactérias diazotróficas representam um grupo funcional fisiologicamente e filogeneticamente diverso. O gene nifH apresenta homologia com os genes vnfH e anfH (Glazer e Kechris,

2009), ambos codificam para nitrogenase reductase nas três distintas nitrogenases (Betancourt et al., 2008).

Na Barra, sedimentos colonizados por *Halimione portucaloides* e *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis* apresentavam comunidades bacterianas com similaridade no gene *nifH*. Exsudatos das raízes de ambas as espécies devem emitir sinais químicos semelhantes atraindo e seleccionando comunidades bacterianas que transportam os mesmos genes para a fixação de azoto. O sedimento controlo como não é colonizado, não sofre influência dos exsudatos das raízes, apresenta comunidades bacterianas com genes funcionais diferentes (alterações no gene *nifH*).

Os sedimentos dos locais Costa Nova e Vagueira apresentaram comunidades bacterianas com elevada diversidade no gene *nifH*, ou seja, num mesmo local foram detectadas comunidades bacterianas diferentes com genes funcionais diferentes, entre sedimentos colonizados e sedimento controlo, e entre sub-amostras.

4.3.2 – Bactérias diazotróficas dos isolados

Verificando que nos diferentes locais em estudo há elevada diversidade no gene *nifH*, tornou-se importante considerar a identificação dos isolados obtidos por sequenciação dos fragmentos do gene 16S rRNA. Os resultados revelam uma prevalência de espécies de *Pseudomonas* em diferentes locais, em sedimentos colonizados por diferentes espécies de planta e em subamostras da mesma espécie.

A ocorrência de fixação de azoto em espécies de *Pseudomonas* tem sido um motivo de controvérsia. Alguns estudos têm identificado estirpes de *Pseudomonas* capazes de fixar azoto (Kulakov et al., 2002; Vermeiren et al., 1999). Estes resultados têm sido interpretados como indicação de que genes envolvidos na fixação de azoto podem estar envolvidos em processos transferência lateral entre espécies bacterianas diferentes. Esta hipótese é suportada, por sua vez, pela filogenia do gene *nifH* (Vermeiren et al., 1999), e por estudos recentes que revelaram que as sequências de aminoácidos codificadas pelo operão *nifHDK* de *Pseudomonas stutzeri* A15 têm homologia (87-91%) com as sequências de *Azotobacter vinelandii* e que a organização do gene *nifH* de *Azotobacter vinelandii* é idêntica à de *Pseudomonas stutzeri* A15 (Desnoues et al., 2003).

Azotobacter vinelandii é uma bactéria diazotrófica que vive livre no solo, sintetiza três tipos de nitrogenases e, ao contrário de outras bactérias diazotróficas, é capaz de fixar azoto na presença de oxigénio. Esta bactéria é equipada com mecanismos para proteger as enzimas nitrogenases da inactivação pelo oxigénio (Betancourt et al., 2008).

Algumas espécies do género *Pseudomonas* têm sido alvo da atenção, com vista à sua potencial utilização como biofertilizante (designadamente *Pseudomonas fluorescens*). Biofertilizantes são preparações que contêm microrganismos com interesse agrícola, ajuda na mobilização de nutrientes para a planta através da actividade biológica. Estes surgem como alternativa aos fertilizantes químicos (Ding et al., 2009). São bactérias capazes de melhorar o crescimento da vegetação através de efeitos directos sobre as plantas, através da produção de substâncias promotoras do crescimento (fito-hormonas), aumentando a disponibilidade e absorção de nutrientes e suprimindo agentes patogénicos ou outros microrganismos nocivos presentes na rizosfera (Gandhi e Saravanckumar, 2009).

Outros isolados foram identificados géneros com reconhecida capacidade diazotróficas, dos quais se destacam *Bacillus sp.* que são abundantes nos solos e são capazes de solubilizar fósforo tornando este nutriente disponível à planta (Freitas et al., 1997). Além disso, como fixam azoto, são bactérias com aplicação na produção de biofertilizantes (*Bacillus megaterium*) (Ding et al., 2009).

5- CONCLUSÃO

Neste estudo foram encontradas diferenças na abundância de bactérias diazotróficas em sedimentos colonizados e não colonizados bem como entre sedimentos colonizados por diferentes espécies de plantas.

Os sedimentos de diferentes bancos de vegetação diferiram entre si e entre sedimentos controle quanto ao teor de matéria orgânica, potencial redox e granulometria.

Nas mesmas condições de salinidade e encharcamento, espécies distintas de plantas revelaram diferenças na concentração de nitrato eventualmente relacionadas por um lado com o seu tipo de metabolismo e por outro, com as comunidades bacterianas presentes na sua rizosfera.

Os perfis de DGGE para fragmentos do gene 16S rRNA das comunidades bacterianas totais demonstraram uma grande heterogeneidade espacial evidenciada por elevada variabilidade entre sub-amostras. Este efeito não permite uma conclusão definitiva quanto à existência de diferenças na estrutura das comunidades bacterianas entre sedimentos colonizados e não colonizados e entre sedimentos colonizados por diferentes espécies de plantas. Esta limitação pode, no entanto, ser ultrapassada complementando os resultados de carácter descritivo obtidos por abordagens de campo, com resultados experimentais obtidos com abordagens de carácter laboratorial em condições de microcosmos.

Um dos objectivos deste trabalho foi avaliar a diversidade funcional das comunidades bacterianas envolvidas na fixação de azoto, considerando que a disponibilidade deste nutriente pode ser um factor limitante no desenvolvimento das plantas de sapal. O estudo da diversidade do gene *nifH* que codifica a enzima nitrogenase reductase foi efectuado através de perfis de DGGE.

Os perfis de DGGE para fragmentos do gene *nifH* revelaram que as comunidades bacterianas em termos funcionais apresentavam menor variabilidade do que em termos estruturais. Dado que, num dos locais em estudo havia similaridade entre as comunidades bacterianas que colonizavam a rizosfera de diferentes espécies.

De entre os isolados obtidos, o género *Pseudomonas* foi o mais representado, o que vem confirmar o seu importante papel na ecologia microbiana de rizosferas em ambientes estuarinos.

Este trabalho confirma o carácter dinâmico da rizosfera de plantas de sapal e identifica funções ecológicas relevantes e intervenientes microbianos de elevado potencial em aplicações de rizoremediação.

6- BIBLIOGRAFIA

- Adam, P. 1993. Salmarsh ecology. *Cambridge University Press*, Cambridge. 461pp.
- Akhani, H., Trimborn, P. e Ziegler, H. 1997. Photosynthetic pathways in chenopodiaceae from Africa, Asia and Europe with their ecological, phytogeographical and taxonomical importance. *Plant Systematics and Evolution*. **206**: 187-221.
- Allen, J. e Pye, K. 1992. Saltmarshes. *Cambridge University Press*, Cambridge. 184 pp.
- Almeida, C.M.R., Mucha, A.P., Bordalo, A.A. e Vasconcelos, M.T.S.D. 2008. Influence of a salt marsh (*Halimione portulacoides*) on the concentrations and potential mobility of metals in sediments. *Science of the Total Environments* **403**: 188-195.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. e Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Anderson, M.J., Gorley, R.N. e Clarke, K.R. 2008. PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to software and statistical methods. PRIMER-E, Plymouth, UK. 214 pp
- Andrade, G., Esteban, E., Velasco, L., Lorete, M.J., Bedmar, E.J. 1997. Isolation and identification of N₂-fixing microorganisms from the rhizosphere of *Capparis spinosa* (L.). *Plant and Soil* **197**: 19-23.
- Arun, A., Raja, P., Arthi, R., Ananthi, M., Kumar, K., e Eyini, M. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation by basidiomycetes Fungi, *Pseudomonas* isolate, and their cocultures: Comparative in vivo and in silico approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **151**: 132 – 142.
- Berg, G. e Smalla, K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **68**:1-13.
- Betancourt, A.D., Loveless, T.M., Brown, J.W. e Bishop, P.E. 2008. Characterization of diazotrophs containing Mo-independent nitrogenases isolated from diverse natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 3471-3480.
- Bishop, A.J.D.G.F., Mossman, H., Redondo-Gómez, S., Castillo, J.M., Castellanos, E.M., Luque, T. e Figueroa, M.E. 2006. Biological flora of the British Isles: *Sarcocornia perennis* (Miller) A.J. Scott. *Journal of Ecology* **94**: 1035-1048.
- Bothe, H., Jost, G., Schlöter, M., Ward, B.B. e Witzel, K.P. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 673-690.
- Burgmann, H., Widmer, F., Sigler, W. V. e Zeyer, J. 2004. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 240-247.
- Burgmann, H., Meier, S., Bunge, M., Widmer, F. e Zeyer, J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environmental Microbiology* **7**: 1711-1724.

- Burke, D.J., Hamerlynk, E.P. e Halin, D., 2002. Interactions among plant species and microorganisms in salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. **68** (3): 1157-1164.
- Castroviejo, S., Laínz, M., González, G., Montserrat, P., Garmendia, F., Paiva, J., e Vilar, L. (Eds.). 1990. Flora Ibérica. VolIII. *Real Jardín Botánico*, C.S.I.C. Madrid.
- Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E. e Youngs, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **6** (1): 71-80.
- Cho, B.C. e Azam, F. 1990. Biogeochemical significance of bacterial biomass in the oceans euphotic zone. *Marine Ecology Progress Series* **63**: 253-259.
- Clarke, K.R. e Warwick, R. M. 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd edition. *PRIMER-E: Plymouth*, UK. 172 pp.
- Colmer, T.D. e Flowers, T.J. 2008. Flooding tolerance in halophytes. *New Phytologist* **179**: 964-974.
- Compeau, G.C. e Bartha, R. 1985. Sulfate-reducing bacteria principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied Environmental Microbiology* **50**: 498-502.
- Constanza, R., Arge, R., Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limrag, K., Naeem, S., O'Neill, R.V., Puelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P. e Belt, M. 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* **387**: 253-260.
- Córdova-Kreylos, A.L., Cao, Y., Green, P.G., Hwang, H.M., Kuivila, K.M., LaMontagne, M.G., Van De Werfhorst, L.C., Holden, P.A. e Scow, K.M. 2006. Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt marsh sediments. *Applied Environmental Microbiology*. **72**: 3357-3366.
- Costa, A.L.V.A.F. 2007. Actividade microbiana nos processos de decomposição em sedimentos de sapais do Estuário do Tejo. Ph.D. Thesis, Faculty of Sciences, *University of Lisbon*, 114pp.
- Costa, R., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G. e Smalla, K. 2006. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology* **56**: 236-249.
- Créach, V., Lucas, F., Deleu, Bertru, G. e Mariotti, A. 1999. Combination of biomolecular and stable isotope techniques to determine the origin of organic matter used by bacterial communities: application to sediment. *Microbiology Methods* **38**: 43-52
- Cunha, M.A., Pedro, R., Almeida, M.A. e Silva, M.H. 2005. Activity and growth efficiency of heterotrophic bacteria in a salt marsh (Ria de Aveiro, Portugal). *Microbiological Research* **160**: 279-290.

- Desnoves, N., Lin, M., Guo, X., Ma, L., Carreno-Lopez, R. e Elmerich, C. 2003. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology* **149**: 2251– 2262.
- Dias, J.M., Lopes, J.F. e Dekeyser. 2000. Tidal propagation in the Ria de Aveiro lagoon, Portugal. *Physics Chemistry of the Earth* **25**: 369-374.
- Ding, Y., Wang, J., Liu, Y. e Chen, S. Isolation and identification of nitrogen fixing *bacilli* from plant rhizospheres in beijing region. *Journal Applied Microbiology* **99**:1271-1281.
- Doeglas, D.J. 1968. Grain-size índices, classification and environment. *Sedimentology* **10**: 8-82.
- Duc, L., Noll, M., Meier, B.E., Burgmann, H. e Zeyer, J. 2009. High Diversity of diazotrophs in the forefield of a receding alpine glacier. *Microbiology Ecology* **57**: 179-190.
- Dudley, B.J., Gahnstrom, A.M.E. e Walker, D.J. 2001. The role of benthic vegetation as a sink for elevated inputs of ammonium and nitrate ina a mesotrophic estuary. *Marine Ecology Progress Series*. **219**: 99-107.
- Engelhard, M., Hurek, T. e Reinhold-Hurek, B. 2000. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus spp.*, in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environmental Microbiology* **2**(2): 131-141.
- Feagin, R.A., Lozada-Bernard, S.M., Ravens, T.M., Moller, L., Yeager, K.M. e Baird, A.M. 2009. Does vegetation prevent wave erosion of salt marsh edges? *Proceedings National Academic of Sciences* **106**: 10109 -10113.
- Flowers, T.J. e Colmer, T.D. 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* **179**: 945-963.
- Flowers, T.J., Hajibaccheri, M.A. e Clipson, N.J. 1986. Halophytes. *The Quarterly Review of Biology* **61**(3): 313-337.
- Flowers, T.J., Troke, P.F. e Yeo, A.R. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **28**: 89-121.
- Freitas, J.R., Banerjec, M.R. e Germida, J.J. 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.) *Biofertil Soils* **24**: 358- 364.
- Gandhi, A. e Saravanckumar, K. 2009. Studies on shelf life of *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas fluorescens* in vemicompost carrier. *Journal of Phytology* **1** (2): 100 – 107
- Glazer, A.N. e Kechris, K.J. 2009. Conserved amino acid sequence features in the α subunits of MoFe, VFe, and FeFe nitrogenases. *Public Library of Science online*. **4**: 1-9.

- Gomes, N.C.M., Heuer, H., Schonfeld, J., Costa, R., Mendonça-Hagler, L. e Smalla, K. 2001. Bacterial diversity of the rizosphere of maize (*Zea Mays*) grown in tropical soil studied by temperature gel electrophoresis. *Plant and Soil*. **232**: 167-180.
- Gomes, N.C.M., Kosheleva, I.A., Abraham, W.R. e Smalla, K. 2005. Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology* **54**: 21.
- Gomes, N.C.M., Borges, L.R., Paranhos, R., Pinto, F.N., Krogerrecklenfort, E., Mendonça-Hagler, L.C.S. e Smalla, K. 2007. Diversity of *ndo* genes in mangrove sediments exposed to different sources of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 7392-7399.
- Grasshoff, K. 1983. Determination of nitrite, 139-142 pp. In Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., (ed.), *Methods of seawater analysis*, 2nd ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
- Grattan, S.R. e Grieve, C.M. 1994. Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. Cap.9. In: Handbook of plant and crop stress. M. Pessarakli (Ed.). *Marcel Dekker, Inc.* 203-226 pp.
- Henry, H.A.L. e Jefferies, R.L. 2002. Free amino acid, ammonium and nitrate concentrations in soil solutions of a grazed coastal marsh in relation to plant growth. *Plant, Cell and Environment* **25**: 665-675.
- Henriques, I.S., Almeida, A., Cunha, A., Correia, A. 2004. Molecular sequence analysis of prokaryotic diversity in the middle and outer sections of the Portuguese estuary Ria de Aveiro. *FEMS Microbiology Reviews* **49**: 260-279.
- Heuer, H., Wieland, G., Schönfeld, J., Schönwälder, A., Gomes, N.C.M. e Smalla, K. 2001. Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis, p. 177-190. In P. Rouchelle (ed.), *Environmental molecular microbiology: protocols and applications*. *Horizon Scientific Press*, Wymondham, United Kingdom.
- Hines, M.E., Evans, R.S., Sharak – Genthner, B.R., Willis, S.G., Fiedman, S., Rooney-varga, J.N. e Devereaux, R. 1999. Molecular phylogenetic and biochemical studies of sulphate – reducing bacteria in the rizosphere of *Spartina alterniflora*. *Applied environmental Microbiology*. **465**: 2209-2216.
- Howes, B.L., Dacey, J.W.H. e Teal, J.M., 1985. Annual carbon mineralization and below ground production of *Spartina alterniflora* in a New England salt marsh. *Ecology* **66**: 595-605.
- Jones, D.L., Farrar, J. e Giller, K.E. 2003. Associative nitrogen fixation and root exudation – what is theoretically possible in the rhizosphere? *Symbiosis* **35**: 19-38.
- Jones, M.N. 1984. Nitrate reduction by shaking with cadmium: alternative to cadmium columns. *Water Research*. **18**: 643-646.

- Joye, S.B. e Paerl, H.W. 1993. Contemporaneous nitrogen fixation and denitrification in intertidal microbial mats: rapid response to runoff events. *Marine Ecology Progress Series* **94**: 267-274.
- Koretsky, C.M., Cappellen, P.V., DiChristina, T.J., Kostka, J.E., Lowe, K.L., Moor, C.M., Roychoudhury, A.N. e Viollier, E. 2005. Salt marsh pore water geochemistry does not correlate with microbial community structure. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **62**: 233-251.
- Kulakov, L. A., McAlister, M. B., Ogden, K. L., Larkin, M. J. e O'Hanlon, J. F. 2002. Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. *Applied Environmental Microbiology* **68**: 1548-1555.
- LaRoque, J.R., Bergholz, P.W., Bagwell, C.E., Lovell, C.R. 2004. Influence of host derived and abiotic environmental parameters on the composition of the diazotroph assemblage associated with roots of *Juncus roemerianus*. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**: 249-261.
- Legendre, P. & L. Legendre, 1998. Numerical ecology, second English edition. *Elsevier*, Amsterdam, 853pp.
- Loveless, T.M., Saah, J.R. e Bishop, P.E. 1999. Isolation of nitrogen-fixing bacteria containing molybdenum – independent nitrogenases from natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4223-4226.
- Lovell, C.R., Decker, P.V., Bagwell, C.E., Thompson e S., Matsui, G. 2008. Analysis of a diverse assemblage of diazotrophic bacteria from *Spartina alterniflora* using DGGE and Clone library screening. *Journal of Microbiology Methods* **73**: 160-171.
- Lugtenberg, B.J.J., Chin-A-Woeng, T.F.C. e Bloemberg, G.V. 2002. Microbe plant-interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leewenhoek* **81**: 373-383.
- Man-Aharonovich, D., Kress, N., Zeev, E.B., Berman-Frank, I. e Béjà, O. 2007. Molecular ecology of nifH genes and transcripts in the eastern Mediterranean Sea. *Environmental Microbiology*.
- Mauseth, J.D. 2003. Botany an introduction to plant biology. *Jones and Bartlett*, Boston (USA). 593-614pp.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. (2^a ed.). *Academic Press*.
- Meyer-Reil, L.A. e Köster, M. 2000. Eutrophication of marine waters: effects on benthic microbial communities. *Marine Pollution Bulletin* **41**: 255-263.
- Mohamed, N.M., Colman, A.S., Tal, Y. e Hill, R.T. 2008. Diversity and expression of nitrogen fixation genes in bacterial symbionts of marine sponges. *Environmental Microbiology*.

Morra, M.J. 2005. Assessment of extracellular enzymatic activity in soil. In: Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V. (eds) *Manual of Environmental –microbiology*. ASM Press, Washington D.C.

Ogilvie, B., Nedwell, D.B., Harrison, R.M., Robinson, A. e Sage, A. 1997. High nitrate, muddy estuaries as nitrogen sinks: the nitrogen budget of the river Colne estuary (United Kingdom). *Marine ecology Progress series* **150**: 217-228.

Osborne, C.P. e Beerling, D. 2006. Nature's green revolution: the remarkable evolutionary rise of C₄ plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **361**: 173-194.

Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S. e Sa, T. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops Korea. *Microbiology Research* **160**: 127-133.

Pritchard, D.C. 1967. What is an estuary; physical viewpoint, 3-5pp. In *Lauf GH (ed.) Estuaries*, A.A.A.S. Publ. No 83, Washington, D.C.

Purinton, T.A. e Mountain, D.C. 1998. Tidal crossing handbook: A volunteer guide to assessing tidal restrictions. *Parker River Clean Water Association*, Byfield, Massachusetts

Quintino, V., Rodrigues, A.M. e Gentil, F. 1989. Assessment of macrozoobenthic communities in the lagoon of Óbidos, western coast of Portugal. *Scientia Marina*. **53**: 645-654.

Rademaker, J.L.W. e Bruijn, F.J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In DNA markers: protocols, applications and overviews, pp 151-171. *Edited by G. Caetano-Anolle e P. M. Gresshoff*, New York: John Wiley.

Raven, H.P., Evert, R.F. e Eichhorn, R.E. 2005. Biology of plants. *Freeman*, New York, USA. 99-396 pp.

Reboredo, F. 1988. Alguns aspectos sobre a acumulação de ferro, cobre e zinco por *Halimione portucaloides* (L.) Aellen. Dissertação de doutoramento. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

Redondo-Gomez, S., Mateos – Naranjo, E., Davy, A. J., Fernandez-Munoz, F., Castellanos, E. M., Lucene, T. e Figueroa, M. E. 2007. Growth and photosynthetic responses to salinity of the salt-marsh shrub *Atriplex portucaloides*. *Annals of Botany* **100**: 555-563.

Rohlf, F.J. 1993. F.J. Rohlf, NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 1.80, *Department of Ecology and Evolution*, State University of New York, Stony Brook, NY.

Rozema, J., Bijwaard, P., Prast, G. e Broekman, R. 1985. Ecophysiological adaptations of coastal halophytes from foredunes and salt marshes. *Vegetation* **62**: 293-301.

- Rueda-Puente, E., Castellanos, E., Troyo-Diéguez, E., Diaz de León-Alvarez, J.L. e Murillo-Amador, B. 2003. Effects of a nitrogen-fixing indigenous bacterium (*Klebsiella pneumonia*) on the growth and development of the halophyte *Salicornia bigelovii* as a new crop for saline environments. *Journal Agronomy e Crop Science* **189**: 323-332.
- Ruiz-Rueda, O., Hallin, S. e Baneras, L. 2009. Structure and function of denitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland. *FEMS Microbiology Ecology* **67**: 308-319.
- Salsac, L., Chaillou, S., Morot-Gaudry, J., Lesaint, C. e Jolivet, E. 1987. Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **25**(6): 805-812.
- Santos, L., Cunha, A., Siva, H., Caçador, I., Dias, J.M. e Almeida, A. 2007. Influence of salt marsh on bacterial activity in two estuaries with different hydrodynamic characteristics (Ria de Aveiro and Tagus estuary). *FEMS Microbiology Ecology* **60**: 429-441.
- Schubauer, J.P. e Hopkins, C.S. 1984. Above - and belowground emergent macrophyte production and turnover in a coastal marsh ecosystem, Georgia. *Limnology and Oceanography* **29**: 1052-1065.
- Semenov, A.M., Van Bruggen, A.H.C. e Zelenev, V.V. 1999. Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat. *Microbiology Ecology* **37**: 116-128.
- Sharma, P.D. 2005. Environmental microbiology. *Alpha science*, U.K. 127-132pp.
- Silva, M.H.A. 2000. Aspectos morfológicos e ecofisiológicos de algumas halófitas do sapal da Ria de Aveiro. Ph.D. Thesis, *University of Aveiro*, 191pp.
- Singh, B.K., Milhard, P., Whiteley, A.S. e Murell, J.C. 2004. Unravelling rhizosphere-microbial interactions opportunities and limitations. *Trends in Microbiology* **8**: 386-393.
- Sinsabaugh, R.L. 1994. Enzymatic analysis of microbial patterns and process. *Biology and Fertility of Soils* **17**: 69-74.
- Smith, S.V. e Hollibaugh, J.T. 1993. Coastal metabolism and oceanic organic carbon balance. *Geophysical*. **31**: 75-89.
- Steunou, A.S., Bhaya, D., Bateson, K.M., Melendrez, M.C., Ward, D.M., Brecht, E., Peters, J.W., Kuhl, M. e Grossman, A.R. 2006. In situ analysis of nitrogen fixation and metabolic switching in unicellular thermophilic cyanobacteria inhabiting hot spring microbial mats. *Proceedings of the National Academic Sciences* **103** (7): 2398-2403.
- Stewart, G.R., Lee, J.A. e Orebamjo, T.O. 1973. Nitrogen metabolism of halophytes. *New Phytologist* **72**: 539-546.

- Tacão, M., Alves, A., Saavedra, M.J. e Correia, A., 2005. Box-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* **88**: 173-179.
- Torsvik, V. e Ovreas, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 240-245.
- Ungar, I.A. 1991. Ecophysiology of vascular halophytes. *CRC Press*, Boca Ratton, USA. 209 pp.
- Vermeiren, H., Willems, A., Schoofs, G., de Mot, R., Keijers, V., Hai, W. e Vanderleyden, J. 1999. The rice inoculant strain *Alcaligenes faecalis* A15 is a nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*. *Systematic Applied Microbiology* **22**: 215 – 224.
- Vernberg, F.J. 1993. Salt-marsh processes: a review. *Environonmental. Toxicology Chemistry* **12**: 2167-2195.
- Waisel, Y. 1972. Biology of halophytes. *Academic Press*, New York. 395pp.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Phytopathology* **26**: 379-407.
- Welsh, D.T. 2000. Nitrogen fixation in seagrass meadows: regulation, plant-bacteria interactions and significance to primary productivity. *Ecology Letters* **3**: 58-71.